

**TEMPERATURABHÄNGIGKEIT VON
STOFFWECHSELGRÖSSEN IN DER
HÄMOGLOBINFREI PERFUNDIERTEN
RATTENLEBER**

Hans-Georg Dietz

1978



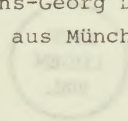
Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus der Kinderchirurgischen Klinik
(Direktor: Prof. Dr. med. W. Ch. Hecker)
der Universitäts-Kinderklinik München
im Dr. von Hauner'schen Kinderspital
und dem Institut für Physiologische Chemie,
Physikalische Biochemie und Zellbiologie
der Universität München

TEMPERATURABHÄNGIGKEIT VON STOFFWECHSELGRÖSSEN
IN DER HÄMOGLOBINFREI PERFUNDIERTEN RATTENLEBER

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
des Fachbereichs Medizin
an der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von
Hans-Georg Dietz
aus München



München

1978

Mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. W. Ch. Hecker

Mitberichterstatter:

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 28.11.1978



Meinen lieben Eltern

1.1	Einleitung	1
1.2	Die Eltern	2
1.3	Die Kindheit	3
1.4	Die Jugend	4
1.5	Die Ehe	5
1.6	Die Kinder	6
1.7	Die Eltern	7
1.8	Die Kindheit	8
1.9	Die Jugend	9
1.10	Die Ehe	10
1.11	Die Kinder	11
1.12	Die Eltern	12
1.13	Die Kindheit	13
1.14	Die Jugend	14
1.15	Die Ehe	15
1.16	Die Kinder	16
1.17	Die Eltern	17
1.18	Die Kindheit	18
1.19	Die Jugend	19
1.20	Die Ehe	20
1.21	Die Kinder	21
1.22	Die Eltern	22
1.23	Die Kindheit	23
1.24	Die Jugend	24
1.25	Die Ehe	25
1.26	Die Kinder	26
1.27	Die Eltern	27
1.28	Die Kindheit	28
1.29	Die Jugend	29
1.30	Die Ehe	30
1.31	Die Kinder	31
1.32	Die Eltern	32
1.33	Die Kindheit	33
1.34	Die Jugend	34
1.35	Die Ehe	35
1.36	Die Kinder	36
1.37	Die Eltern	37
1.38	Die Kindheit	38
1.39	Die Jugend	39
1.40	Die Ehe	40
1.41	Die Kinder	41
1.42	Die Eltern	42
1.43	Die Kindheit	43
1.44	Die Jugend	44
1.45	Die Ehe	45
1.46	Die Kinder	46
1.47	Die Eltern	47
1.48	Die Kindheit	48
1.49	Die Jugend	49
1.50	Die Ehe	50
1.51	Die Kinder	51
1.52	Die Eltern	52
1.53	Die Kindheit	53
1.54	Die Jugend	54
1.55	Die Ehe	55
1.56	Die Kinder	56
1.57	Die Eltern	57
1.58	Die Kindheit	58
1.59	Die Jugend	59
1.60	Die Ehe	60
1.61	Die Kinder	61
1.62	Die Eltern	62
1.63	Die Kindheit	63
1.64	Die Jugend	64
1.65	Die Ehe	65
1.66	Die Kinder	66
1.67	Die Eltern	67
1.68	Die Kindheit	68
1.69	Die Jugend	69
1.70	Die Ehe	70
1.71	Die Kinder	71
1.72	Die Eltern	72
1.73	Die Kindheit	73
1.74	Die Jugend	74
1.75	Die Ehe	75
1.76	Die Kinder	76
1.77	Die Eltern	77
1.78	Die Kindheit	78
1.79	Die Jugend	79
1.80	Die Ehe	80
1.81	Die Kinder	81
1.82	Die Eltern	82
1.83	Die Kindheit	83
1.84	Die Jugend	84
1.85	Die Ehe	85
1.86	Die Kinder	86
1.87	Die Eltern	87
1.88	Die Kindheit	88
1.89	Die Jugend	89
1.90	Die Ehe	90
1.91	Die Kinder	91
1.92	Die Eltern	92
1.93	Die Kindheit	93
1.94	Die Jugend	94
1.95	Die Ehe	95
1.96	Die Kinder	96
1.97	Die Eltern	97
1.98	Die Kindheit	98
1.99	Die Jugend	99
2.00	Die Ehe	100

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. EINLEITUNG	1
1.1. Problemstellung	1
2. METHODIK	3
2.1. Hb-freie Leberperfusion	3
2.1.1. Perfusionsapparatur	4
2.1.2. Perfusionslösung	6
2.1.3. Tiermaterial	6
2.1.4. Operationstechnik	8
2.1.5. Versuchsablauf	8
2.2. O ₂ -Messungen	9
2.3. Metabolitbestimmungen	9
2.4. ¹⁴ CO ₂ -Bestimmung	10
2.5. Die Perfusion als Modell	10
3. FRAGESTELLUNG UND VERSUCHSPROGRAMM	11
3.1. Fragestellung	11
3.2. Versuchsprogramm	11
3.2.1. Stoffwechseluntersuchungen	11
3.2.1.1. Katabole Prozesse	11
3.2.1.2. Anabole Prozesse	12
3.2.2. Vitalitätsparameter	12
3.2.2.1. Stoffwechselleistungen unter verschiedenen Bedingungen	12
3.2.2.2. Enzymverlustmessungen	13
3.2.2.3. pH-Messungen des ausfließenden Perfusates	13
4. AUSWERTUNGEN	14
4.1. Änderung der Produktionsgeschwindigkeiten in Abhängigkeit von der Temperatur	14
4.2. ARRHENIUS-Gleichung, AKRHENIUS-Diagramme	16
4.2.1. ARRHENIUS-Gleichung	16
4.2.2. Darstellung der Ergebnisse im ARRHENIUS-Diagramm	16
4.3. Aktivierungsenergien und Q ₁₀ -Werte	17
4.3.1. Aktivierungsenergie	17
4.3.2. Der Q ₁₀	17

	Seite
4.4. Versuchsergebnisse	18
4.4.1. Katabole Stoffwechselwege	18
4.4.2. Anabole Stoffwechselwege	30
4.5. Vitalitätsparameter	38
4.5.1. Langzeitperfusionen	38
4.5.2. Kältelagerung	39
4.5.3. Intermittierende Schwerkraftperfusion	39
4.5.4. Bestimmung der Enzymverluste	39
4.5.5. pH-Messungen	42
5. DISKUSSION	43
5.1. Probleme der Hypothermie	43
5.2. Die Aktivierungsenergie und der Q_{10}	44
5.3. Die Temperaturabhängigkeit der enzymatischen Reaktion	45
5.4. Unstetigkeiten im ARRHENIUS-Diagramm	46
6. ZUSAMMENFASSUNG	51
7. AUSBLICK	52
8. LITERATURVERZEICHNIS	54

1. EINLEITUNG

In der Behandlung kongenitaler Dysgenesien oder irreversibler entzündlicher, toxischer oder traumatischer Schäden lebenswichtiger Organe findet die konventionelle Chirurgie ihre Grenzen. Die Transplantation eines Fremdorgans, als Ersatz für das funktionsuntüchtige Organ, bereichert die bislang ausschließlich symptomatischen Therapiemöglichkeiten um eine kausale. Der Ersatz kann endgültig oder auch nur temporär sein. In der Therapie bestimmter Lebererkrankungen können beide Möglichkeiten ihre Anwendung und Indikation finden. Der endgültige Ersatz findet seine Indikation bei kongenitaler Atresie der intrahepatischen Gallengänge und bestimmten Formen der extrahepatischen Gallengangsatresie; da Behandlungsversuche mit bilio-digestiven Anastomosen nach Kasai nur in seltenen Fällen eine Heilungsmöglichkeit bieten; darüber hinaus bei Hepatomen, bei angeborenen isolierten Stoffwechselerkrankungen (Du Bois et al., 1971) und in Terminalstadien von Zirrhosen. Der temporäre Ersatz durch ein extra- oder intracorporal liegendes Hilfsorgan wäre dann angezeigt, wenn Aussicht besteht, die Phase des Leberausfalles solange zu überbrücken, bis die Leberreste bzw. die Leberregenerate wieder eine suffiziente Funktion aufnehmen können. Solche Situationen können bei Pilz- oder anderen Vergiftungen oder bei maligner Hepatitis mit akuter gelber Leberdystrophie gegeben sein.

1.1. Problemstellung

Die Probleme der Organtransplantation sind:

- a) die operative Technik,
- b) die Kenntnis immunologischer Abstoßungsvorgänge und deren Suppression,
- c) die optimale Organkonservierung.

Die bislang einzig sichere Aussage über die Vitalität einer kon-

servierten Leber bietet nach dem Stand der gegenwärtigen Literatur (Abouna et al., 1971; Brettschneider et al., 1968; De Miguel et. al., 1974) die erfolgreiche Transplantation, die der Empfänger mindestens 4 Tage überleben muß. Aus diesem Grunde ist es ein dringendes Anliegen, Kriterien zu finden, die bereits vor der Transplantation sichere Aussagen über die Funktionsfähigkeit des konservierten Organs erlauben.

Die Chancen für eine erfolgreiche Organkonservierung erhöhen sich mit der Möglichkeit, den Bau- und Energiestoffwechsel in der Phase der Organkonservierung zu reduzieren, was durch Hypothermie, d. h. durch Abkühlen des zu erhaltenden Organs erreicht werden kann. Dabei ergibt sich jedoch aus biochemischer Sicht folgende Problematik: Es ist nicht zu erwarten, daß im Rasterwerk des Intermediärstoffwechsels sämtliche Prozesse in gleicher Weise verlangsamt werden. Die unterschiedlichen Temperaturabhängigkeiten der verschiedenen Intermediärprozesse könnten deshalb zu Koordinationsstörungen der ineinanderübergreifenden Reaktionsketten des Stoffwechsels der Zelle führen - zu Blockierungen des "Fließgleichgewichtes" -, die dann die Funktions- und somit Lebensfähigkeit eines Organs beeinträchtigen. Die Konsequenz dieser Überlegungen ist folgende: Als optimale Konservierungstemperatur des isolierten Organs muß diejenige angesehen werden, die eine ausreichende Senkung der Stoffwechseltätigkeit der Zellen bewirkt, ohne daß wesentliche Störungen in der Stoffwechselkoordination auftreten. Es ist daher erforderlich, die Temperaturabhängigkeiten und die Koordination der einzelnen Stoffwechselprozesse zu untersuchen. Erst die Kenntnis dieser Parameter geben uns Interpretationsmöglichkeiten hinsichtlich:

- a) Konservierbarkeit des Organs,
- b) Koordinationsstörungen im Intermediärstoffwechsel,
- c) optimaler Konservierungstemperatur.

Unseres Wissens wurden noch keine diesbezüglichen Untersuchungen durchgeführt.

2. METHODIK

2.1. Hb-freie Leberperfusion

Die Perfusion des isolierten und funktionstüchtigen Organs ermöglicht die Untersuchung von Stoffwechselvorgängen und stellt zudem eine geeignete Methode dar, die für die Organerhaltung Verwendung finden könnte. Das Kreislaufprinzip und die morphologische Organisation entsprechen bei einem solchen Perfusionsexperiment den Verhältnissen in vivo (Zimmer, 1973). Die Vorteile dieser Organperfusionen sind: Ein isoliertes Organ ist sowohl der Steuerung als auch anderweitigen Einflüssen des Gesamtorganismus entzogen. Man kann die Versuche unter identischen und damit vergleichbaren Bedingungen durchführen. Trotz des weitreichenden Eingriffs durch diese Art der Präparation können wir dennoch mit gewissen Einschränkungen von physiologischen Zuständen sprechen und unsere Interpretationen in diesem Sinn durchführen.

Corey, Britten (1941) und Trowell (1942) waren die ersten, die an perfundierten Lebern Stoffwechseluntersuchungen vornahmen. Brauer et al. (1951) und Miller et al. (1951) benützten für ihre Untersuchungen dieselbe Methode. Als Perfusionsmedium diente Miller heparinisiertes Rattenblut, Schimassek (1962) dagegen verwendete ein halbsynthetisches Medium, nämlich eine Salzlösung, der Rinderalbumin und gewaschene Rindererythrozyten zugesetzt waren. Erst die Hb-freie Leberperfusion durch Scholz und Bücher (1965, 1967) konnte die Komplexität des Untersuchungsobjektes weiter einschränken, indem sie eine Salzlösung mit Plasmaexpandern als Perfusionsmedium benützten. Allerdings mußte jetzt die Durchströmungsgeschwindigkeit erhöht werden, um der Leber ein ausreichendes Sauerstoffangebot in Form von physikalisch gelöstem Sauerstoff anzubieten. Das Fehlen von Hb in der Perfusionslösung eröffnet dann zugleich die Möglichkeit der exakten Sauerstoffmessung durch die Anwendung der Platinelektrode nach Clark (1953, 1956). Im folgenden wird diese Perfusionsmethode und ihre Modifizierungen beschrieben.

2.1.1. Perfusionsapparatur

In unseren Versuchen wurden die Lebern mit einem nicht rezirkulierendem Perfusat durchströmt, d. h. ein offenes System verwendet. Die Vorteile dieser Perfusionsmethode sind die exakten Bestimmungen von arterio-venösen Differenzen der einzelnen Substrate. Zudem besteht bei dieser Art der Perfusion die Möglichkeit, die Leber über einen beliebigen Zeitraum hin mit einem Medium konstanter Zusammensetzung zu perfundieren. Nachteile sind die geringen Konzentrationen von Enzymen und Elektrolytänderungen im ausfließenden Perfusat. Für die Perfusionsexperimente wurde die von Scholz (1967) beschriebene Apparatur verwendet. Einige Änderungen mußten vorgenommen werden. *) Das Blockdiagramm in Abb. 1 zeigt schematisch den Aufbau der Apparatur.

Aus einem Vorratsgefäß (A), das das Perfusat mit seinen Zusätzen für einen Versuch enthält, wurde das Perfusat mit einer Rollpumpe (B) durch eine Temperierschlange (C) (die im Flüssigkeitsbad des Thermostaten (D) lag) in einen Schlauchoxygenator (E) gepumpt. Dieser Schlauchoxygenator, mit einem temperierbaren Aluminiumkern, übernahm die Sauerstoffaufsättigung und die Temperierung des Perfusionsmediums. Der Programmgeber (F) brachte die Temperierflüssigkeit des Thermostaten (D) - ein Gemisch aus Aqua dest. und Äthanol, um ein Einfrieren zu verhindern - auf die jeweils gewünschte Temperatur. Vor dem Oxygenator befinden sich noch zwei Filter, die Perfusatverunreinigungen eliminieren. Das sauerstoffaufgesättigte Perfusat wird der Leber, die in der Perfusionskammer (G) gelagert wird über die Vena portae zugeleitet. Vor der Leber befindet sich noch eine Blasenfalle, die Luftembolien verhindern soll. Das Perfusat verläßt die Leber über die obere Hohlvene. Es wird an einer Sauerstoff-Elektrode (H), sowie einer pH-Elektrode (J) vorbei in ein Überlaufgefäß (K) geleitet. Aus diesem Gefäß werden die Proben für die Analysen entnommen.

*) Die Perfusionsapparatur wurde in den Werkstätten des Institutes für Physiologische Chemie der Universität München und des SFB 51 durch A. Schallweg und Dr.-Ing. H. Schwab konstruiert.

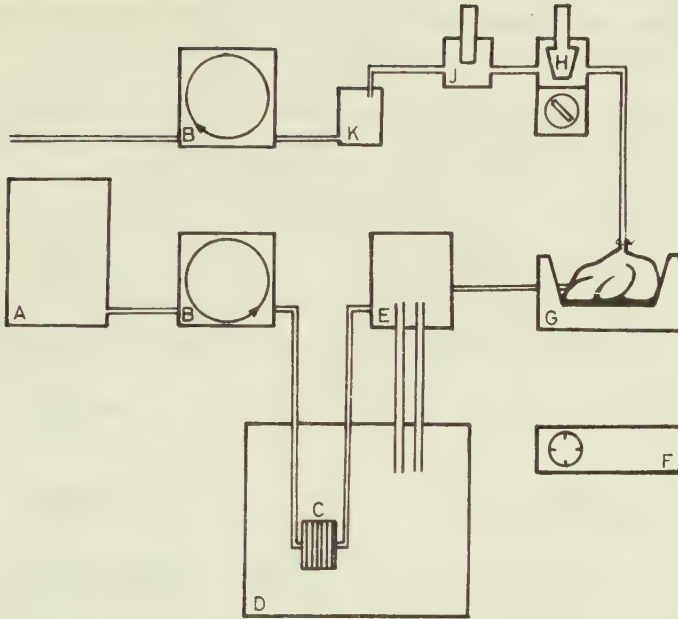


Abb. 1 Aus dem Vorratsgefäß (A) wird die Perfusionslösung von der Rollenpumpe (B) - nach Passieren der Temperierschlange (C) im Thermostaten (D), der durch den Programmgeber (F) geregelt wird, und des Oxygenators (E) - in die Leber in der Perfusionskammer (G) gepumpt. Die zweite Rollenpumpe (B) saugt das Perfusat aus dem Überlaufgefäß (K) nach der Messung von der O_2 -Spannung - O_2 -Elektrode mit Rührwerk (H) -, und dem pH-Wert - pH-Elektrode (J) - ab.

Zur Sauerstoffaufsättigung des Perfusionsmediums benützten wir einen Diffusionsoxygenator, der an der Außenseite seines temperierbaren Aluminiumkernes zwei durch einen Silikonkautschuk-Schlauch getrennte Räume besitzt. Das Perfusionsmedium, welches

das Innere des 9 m langen und 0,2 cm dicken, für Gase permeablen Schlauches des Oxygenators durchströmt, wird im Gegenstrom durch das aufsteigende Gasgemisch gesättigt.

Die Oxygenierung der Perfusionslösung, die den Oxygenator durchströmt, ist sowohl von der Länge als auch von der Durchfließgeschwindigkeit abhängig. Bei einer Schlauchlänge von 9 m und mit Perfusionsgeschwindigkeiten von 30 - 40 ml/min erreichen wir eine annähernd vollständige Aufsättigung des Perfusates mit dem Sauerstoff-Kohlendioxid-Gemisch - bei 37° C -. Bei Experimenten mit an Kohlenstoffatomen radioaktiv markierten Substraten wurden mit Infusionspumpen genau definierte Mengen pro Zeiteinheit dem Perfusat zugegeben.

2.1.2. Perfusionslösung

Als Perfusat dient eine Elektrolytlösung, wie sie von Krebs und Henseleit (1932) angegeben wurde. Tabelle 1 zeigt die Zusammensetzung dieser Lösung. Somit befinden sich in der Lösung keine onkotisch wirksamen Substanzen. Mit dem wasserdampfgesättigten Gasgemisch ($O_2 : CO_2 = 95 : 5$) wird das Perfusat im Oxygenator aufgesättigt. Mit Hilfe eines Bicarbonatpuffers (25 mM HCO_3^- , 5 % CO_2) wird ein pH-Wert von 7,4 konstant gehalten.

2.1.3. Tiermaterial

Als Versuchstiere wurden männliche Wistar-II-Ratten (Stamm Chbb Tierzüchtung der Firma Thomae, Biberach) im Gewicht von 160 - 210 g verwendet. Die Tiere erhielten "Altromin"* Standardfutter und Wasser ad libitum. Für Versuche mit glykogenverarmten Lebern wurde den Ratten 24 h vor Operationsbeginn das Futter entzogen. Die Präparation der Leber erfolgte in Pentobarbitalnarkose (Nem-

* (Altromin: Fa. Altromin, Lippe, Westfalen)

butal, Deutsche Abott GmbH, Ingelheim, 5 mg/100 g Lebendgewicht, intraperitoneal). Bei den Tieren bestand im gefütterten Zustand im Mittel eine Relation von 3,8 g Leber pro 100 g Körpergewicht.

KREBS-HENSELEIT

NaCl	115.0 mM
NaHCO ₃	25.0 mM
KCl	5.9 mM
MgCl · 6 H ₂ O	1.2 mM
NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O	1.2 mM
Na ₂ SO ₄	1.2 mM
CaCl ₂	2.5 mM

Tabelle 1 Die Zusammensetzung des Krebs-Henseleit-Puffers

2.1.4. Operationstechnik

Als erstes wird dem narkotisierten Versuchstier mit einem Medianschnitt das Abdomen eröffnet und der Magen von Milz und Leber freipräpariert. Der Ösophagus und die Magenarterien werden unterbunden und abgetrennt und der Magen-Darm-Trakt zur Seite geschoben. Die Vena cava inf. wird oberhalb den Nierenvenen angeschlungen. Um die Pfortader werden nun 2 lockere Ligaturen gelegt, wobei die proximale den am weitesten leberwärts gelegenen Zufluß erfassen, den Gallengang aber freilassen muß. Die Vena portae wird nun eröffnet und eine Polyäthylenkanüle eingeführt und fixiert. Bei einer Perfusion von 1 ml/g/min ist die Leber nach 2 - 3 Sekunden entblutet und zeigt die gelbbraune Eigenfarbe. Nach Ligatur der Vena cava inf. und Eröffnen der Aorta abdominalis wird der Thorax parasternal eröffnet. Durch das rechte Herzohr wird nun eine zweite Polyäthylenkanüle in die Vena cava sup. bis zur Lebervenenmündung vorgeschoben und mit einem Zwerchfellzipfel zur Fixation eingebunden. Der Flow wird auf 4 - 5 ml/g Leber/min erhöht, die Leber aus dem Situs freipräpariert und in die Perfusionskammer gebracht. Die gesamte Operation dauert etwa 10 Minuten. Eine, wenn auch nur bedingte Phase der Hypoxie kann nur zwischen der Incision der Pfortader und der Flasterhöhnung nach der Eröffnung des rechten Herzohres vorliegen, also höchstens 2 Minuten. Eine hypoxische Schädigung der Leber zur Zeit der Operation kann somit weitgehend ausgeschlossen werden (Scholz, 1967).

2.1.5. Versuchsablauf

Nach der Präparation der Leber wurde zunächst bei 37° C ungefähr 30 Minuten perfundiert. Anschließend wurde die Temperatur kontinuierlich mit einer Geschwindigkeit von 1/2° C/min gesenkt. Nach ca. 70 Minuten war eine Temperatur des Perfusates von 0,5° C erreicht. In der Kälte wurde dann, je nach Fragestellung des Experimentes, zwischen 5 min und 24 h perfundiert. (Mit konstantem Durchflußvolumen, mit reduziertem Durchflußvolumen und mit

intermittierender Schwerkraftperfusion.) Anschließend wurde das Perfusat erneut kontinuierlich mit der gleichen Geschwindigkeit auf 37° C erwärmt. In einigen Experimenten wurde dieser Zyklus von Abkühlen und Erwärmen mehrmals wiederholt. Es wurde noch über einen Zeitraum von 30 Minuten bei 37° C weiterperfundiert und dann das Experiment beendet. Die Leber wurde dann aus der Perfusionskammer genommen, von Fascien, Gefäßbindegewebe und Diaphragma freipräpariert, zerstückelt, zwischen Filterpapier getrocknet und anschließend gewogen.

Bei den ersten Versuchen wurden die Perfusatsproben alle 2 Minuten entnommen. Wegen der Unsicherheit der graphischen Zuordnung der Temperaturpunkte zu der Zeitachse entnahmen wir später pro Temperaturänderung um 1° C (Δ° C) eine Perfusatsprobe.

2.2. O₂-Messung

Die uns zur Verfügung stehenden Sauerstoffelektroden waren alle temperaturabhängig. Wir konnten deshalb keine gesicherten quantitativen Messungen des Sauerstoffverbrauches durchführen.

2.3. Metabolitbestimmungen

Im Abstand von 2 Minuten - später wurden nur die Proben bei 37° C 2-minütlich entnommen, die anderen Proben wurden pro Δ° C entnommen - wurden Proben aus dem ausfließenden Perfusat unmittelbar hinter der Leber entnommen. Die Konzentrationen der folgenden Metabolite wurden mit Hilfe standardisierter Methoden im optisch-enzymatischen Text bestimmt (Warburg, 1938): Glucose, Lactat, Pyruvat, β -Hydroxybutyrat, Acetoacetat, Harnstoff und Ammoniak. Aus den arterio-venösen Differenzen der Metabolitkonzentrationen und den konstanten Durchströmungsvolumina wurde die Geschwindigkeit der Produktion dieser Metabolite berechnet und auf das Lebergewicht (Feuchtgewicht nach Versuchsende) bezogen.

2.4. $^{14}\text{CO}_2$ -Bestimmung

Das Perfusat wurde in 2-Minuten-Fractionen aufgefangen. Das CO_2 wurde durch Ansäuerung (Salzsäure) ausgetrieben und in Phenyl-äthylamin aufgefangen. Aus der durch Flüssigkeits-Szintillations-Spektrometrie im CO_2 gefundenen Radioaktivität wurde mit Hilfe der spezifischen Aktivität der Substrate die Geschwindigkeit der $^{14}\text{CO}_2$ -Produktionen berechnet.

2.5. Die Perfusion als Modell

Scholz und Mitarbeiter sind seit 13 Jahren bemüht, die Leberperfusion zu vereinfachen und zu standardisieren, um die Komplexität des Untersuchungsobjektes einzuschränken (Zimmer, 1973). Die schrittweise Entfernung des Untersuchungsobjektes von den physiologischen Verhältnissen bedeutet aber eine Vereinfachung, die nicht unbedingt Rückschlüsse auf "in vivo"-Bedingungen zuläßt.

Für die Erforschung der Möglichkeit der Organkonservierung stellt die isolierte Leber dennoch wieder ein "physiologisches System" dar. Dieses Modell scheint daher geeignet, fehlende Informationen auf diesem Gebiet systematisch zu erarbeiten.

3. FRAGESTELLUNG UND VERSUCHSPROGRAMM

3.1. Fragestellung

Es sollten folgende 2 Fragekomplexe, die eng miteinander verbunden sind und auch ineinander übergreifen, bearbeitet werden:

- a) Die Temperaturabhängigkeit einzelner Reaktionen im Intermediärstoffwechsel.
- b) Untersuchungen zur Konservierbarkeit eines isolierten Organes. Dabei stehen die Probleme der optimalen Konservierungstemperatur, sowie die Art der Konservierung im Vordergrund.

3.2. Versuchsprogramm

3.2.1. Stoffwechseluntersuchungen

3.2.1.1. Katabole Prozesse

- a) Glykolyse in Lebern von gefütterten Ratten durch Messung der Produktion von Lactat und Pyruvat. (Berechnung der Glykolyse aus $1/2$ (Lactat + Pyruvat))
 1. aus endogenem Substrat, d. i. Glykogen
 2. aus exogenem Substrat, d. i. 46 (bzw. 60) mM Glucose
- b) Fructolyse aus 10 mM D(-)-Fructose in Lebern von gehungerten Ratten durch Messung der Produktion von Lactat und Pyruvat.
- c) Glykogenolyse in Lebern von gefütterten Ratten durch Messung der Produktion von Glucose, Lactat und Pyruvat. (Berechnung der Glykogenolyse aus Glucose + $1/2$ (Lactat + Pyruvat))
- d) Ketogenese aus 0,5 mM und 1,0 mM Octanoat in Lebern von gefütterten Ratten durch Messung der Produktion von Acetoacetat und β -Hydroxybutyrat.

- e) $^{14}\text{CO}_2$ -Produktion in Lebern von gefütterten Ratten durch Messung von $^{14}\text{CO}_2$ im Szintillationszähler
 1. aus Octanoat-1- ^{14}C (0,5 mM)
 2. aus Pyruvat-3- ^{14}C (0,2 mM und 1,2 mM).
- f) Pyruvat Oxydation in Lebern von gefütterten Ratten durch Messung von $^{14}\text{CO}_2$ im Szintillationszähler aus Pyruvat-1- ^{14}C (1,2 mM und 5,5 mM).

3.2.1.2. Anabole Prozesse

- a) Gluconeogenese in Lebern von gehungerten Ratten durch Messung der Glucoseproduktion
 1. aus Lactat und Pyruvat (2 mM und 0,25 mM, 4 mM und 0,5 mM)
 2. aus Alanin (3 mM, 9 mM, 18 mM)
 3. aus Fructose (10 mM D(-)-Fructose)
- b) Harnstoffsynthese in Lebern von
 1. gehungerten Ratten aus Alanin (3 mM, 9 mM, 18 mM)
 2. gefütterten Ratten aus Ammoniak (5 mM) (In diesen Experimenten wurde dem Perfusat zusätzlich 10 mM Ornithin zugegeben.)

3.2.2. Vitalitätsparameter

3.2.2.1. Stoffwechselleistungen unter verschiedenen Bedingungen

- a) Langzeitperfusionen
 - 1.5-Stunden-Experimente
 - 2.24-Stunden-Experimente

b) Kältelagerung

1.5-Stunden-Experimente

2.48-Stunden-Experimente

c) Intermittierende Schwerkraftperfusion

24-Stunden-Lagerung, 4-stündliche Perfusionen

3.2.2.2. Enzymverlustmessungen

Es wurden die Aktivitäten von folgenden Enzymen im ausfließenden Perfusat bestimmt.

a) LDH

b) GlDH

c) GOT

d) GPT

3.2.2.3. pH-Messungen des ausfließenden Perfusates

In 5 Versuchen wurden die pH-Änderungen kontinuierlich registriert.

4. AUSWERTUNGEN

4.1. Änderung der Produktionsgeschwindigkeiten in Abhängigkeit von der Temperatur

Die lineare Auftragung der gemessenen Produktionsgeschwindigkeiten gegen die Temperatur zeigt durchwegs ein Absinken der Produktionsgeschwindigkeiten mit dem Absinken der Temperatur des Perfusates. In gleicher Weise fanden wir mit dem Ansteigen der Temperatur einen Anstieg der Produktionsgeschwindigkeiten. Zudem zeigt diese Darstellung, daß die gemessenen Stoffwechselprozesse nach Wiedererreichen der Ausgangstemperatur reversibel waren (siehe Abb. 2).

Einen interessanten Verlauf zeigen die Langzeitexperimente, bei denen die Glykolyse beobachtet wurde. Mit zunehmender Perfusionsdauer in der Hypothermie konnten wir einen starken Anstieg der Lactatproduktion beobachten. Als Erklärung bieten sich folgende Überlegungen an:

- a) Pyruvat und Lactat stehen über das Enzym LDH im chemischen Gleichgewicht. Pyruvat - das Endprodukt der Glykolyse - kann entweder über den Citratzyklus oxydiert werden, oder, entsprechend dem Redoxzustand der Zelle, zu Lactat reduziert werden. So überwiegt bei der Verfügbarkeit von Sauerstoff die Oxydation, während bei einem Mangel an Sauerstoff die Umwandlung zu Lactat bevorzugt wird. Da bei der Lactatbildung NADH reoxydiert wird, kann auch in Abwesenheit von Sauerstoff die Glykolyse uneingeschränkt ablaufen, da genügend NAD für die Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase-Reaktion gebildet wird (Harper et al., 1975).
- b) Der Lactatanstieg kann zudem Ausdruck einer Entkoppelung zwischen Glykolyse und Citratzyklus sein.
- c) Er kann außerdem Ausdruck einer Zellschädigung sein (Abb. 2a). Nach Wiedererreichen der Normothermie fanden wir stets einen weitgehenden Rückgang der Lactatproduktion. Somit kann die

Möglichkeit reversibler hypothermer Störungen angenommen werden.

Im Gegensatz dazu konnten wir bei der Betrachtung der Harnstoffsynthese nur eine geringe Temperaturabhängigkeit der Produktionsgeschwindigkeiten beobachten (Kirk, 1936).

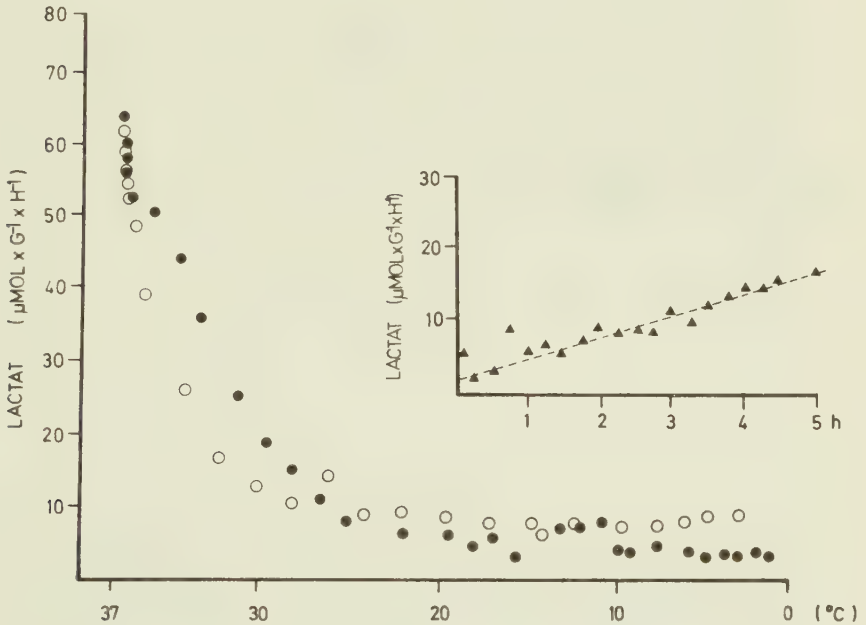


Abb. 2 Lactat Produktion bei einem Zyklus von Abkühlen, 5-stündigem Kälteplateau und Wiedererwärmen

Eine isolierte Leber von einer normal gefütterten Ratte wurde mit K-H-Puffer perfundiert. Die Produktion von Lactat wurde während einer "off"-(o) und einer "on"-Phase (●) im Bereich von 37° C bis 0,5° C graphisch dargestellt. Im weiteren zeigt die Abbildung die Lactat Produktion (▲) während der 5-stündigen Perfusion bei 0,5° C.

a) Abscisse: t in ° C

Ordinate: µMol/g/h

b) Abscisse: Zeit in h

Ordinate: µMol/g/h

4.2. ARRHENIUS-Gleichung, ARRHENIUS-Diagramme

4.2.1. ARRHENIUS-Gleichung

Arrhenius (1915) postulierte folgende Beziehung zwischen der Reaktionsgeschwindigkeit eines chemischen Prozesses und der Temperatur:

$$\frac{d \ln k}{dT} = - \frac{E}{R \cdot T^2}$$

k = Reaktionskonstante

R = Gaskonstante

T = absolute Temperatur

E = Aktivierungsenergie

Bei Integration ergibt sich folgende Gleichung:

$$\ln k = - \frac{E}{R \cdot T} + C$$

und

$$\lg k = - \frac{E}{2,303 \cdot R \cdot T}$$

Die Aktivierungsenergie E kann somit aus der Steigung der Geraden im ARRHENIUS-Diagramm berechnet werden. Vorausgesetzt wird dann allerdings, daß die Reaktionsgeschwindigkeit der Reaktionskonstanten proportional ist. Dabei muß das Enzym allerdings mit Substrat abgesättigt sein.

$$V = k_{+2}(E_0) \text{ (Dawes)}$$

4.2.2. Darstellung der Ergebnisse im ARRHENIUS-Diagramm

Die Ergebnisse wurden im sogenannten ARRHENIUS-Diagramm, d. h. $\log V$ als Funktion des Reziprokwertes der absoluten Temperatur, aufgetragen. In den Abbildungen 3 und 6, in denen mehrere

gleichartige Experimente wiedergegeben sind, wurden die Einzelwerte auf den Mittelwert bei 37° C transponiert. Die Abbildungen lassen erkennen, daß die Temperaturabhängigkeiten eines Parameters bei mehreren Experimenten gut reproduzierbar sind. Sie zeigen weiterhin, daß die Werte der Abkühlungs- und Aufwärmphasen nur relativ gering voneinander abweichen. Wie aus diesen Abbildungen zu erkennen ist, besteht eine lineare Beziehung zwischen $\log V$ und $\frac{1}{T}$. Diese Linearität ist entweder über den gesamten Temperaturbereich von 37° C bis 1° C oder in einzelnen Temperaturabschnitten gegeben, so daß sogenannte "Knickpunkte" entstehen.

Durch die linearen Abschnitte wurden Geraden gezogen, die den Werten am günstigsten angepaßt schienen (d. h. keine Berechnung der Regressionsgeraden).

4.3. Aktivierungsenergien und Q_{10} -Werte

4.3.1. Aktivierungsenergie

Aus den Steigungen dieser Geraden wurde die Aktivierungsenergie E berechnet, das ist die Energie, die nötig ist um eine Reaktion ablaufen zu lassen. E wurde mit Hilfe der Steigung der Geraden im ARRHENIUS-Diagramm d. h. $\log V / \frac{1}{T}$ entsprechend der Gleichung $E = R \cdot 2,3 \cdot \log V / \frac{1}{T}$ berechnet.

4.3.2. Der Q_{10}

Die Geschwindigkeit einer chemischen Reaktion wächst mit der Temperatur. Der Temperaturkoeffizient wird als Q_{10} angegeben und er beträgt für chemische Reaktionen normalerweise 2. Bei enzymatischen Reaktionen muß allerdings der Proteincharakter des Enzyms berücksichtigt werden, man erwartet daher verschiedene Q_{10} -Werte (Dixon, Webb, 1958).

Der Q_{10} , der auch aus den Geraden im ARRHENIUS-Diagramm be-

rechnet wurde, ist der Faktor, um den die Geschwindigkeit einer Reaktion bei einer Temperaturänderung von 10°C absinkt bzw. ansteigt.

4.4. Versuchsergebnisse

4.4.1. Katabole Stoffwechselwege

Als erster Stoffwechselweg wurde die Glykolyse aus endogener Glucose untersucht. Die Geschwindigkeit der Lactat- und Pyruvat-Produktion wurde in erster Näherung als Maß für die Aktivität der Glykolyse unter den gegebenen Bedingungen angenommen. Abb. 3 zeigt 5 gleichartige Experimente, deren Ergebnisse im ARRHENIUS-Diagramm graphisch dargestellt wurden. Man sieht, daß bei 3 Versuchen ($\circ, \Delta, \bullet$) eine lineare Beziehung im gesamten Temperaturbereich, von 37°C bis $0,5^{\circ}\text{C}$ besteht. 2 Experimente ($\square, \nabla$) zeigen diese Linearität nur im Bereich von 37° bis 25° ($\square$), beziehungsweise von 37° bis 15° (∇). Es liegt hier keine reine Temperaturabhängigkeit einer Schrittmacherreaktion vor, hier sind vielmehr mehrere Prozesse im Spiel. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurden nur die "off-Phasen" in die Darstellung aufgenommen. Aus der Steigung der durch die aufgezeichneten Punkte gelegten Geraden wurden ein E von 80 kJ/Mol und ein Q_{10} von $3,0$ berechnet. Einschränkend muß hierzu bemerkt werden, daß die Darstellung nach ARRHENIUS nur dann gerechtfertigt ist, wenn V_{max} -Bedingungen vorliegen, dies ist bei der endogenen Glykolyse allerdings fraglich.

In einer weiteren Versuchsreihe untersuchten wir die Glykolyse unter Bedingungen, die eine maximale Stimulierung dieser Reaktion zur Folge haben sollte. Wir perfundierten Lebern mit 46 und 60 mM Glucose-KH-Lösungen. In den Versuchen mit den zwei verschiedenen Glucosekonzentrationen konnten keine Unterschiede sowohl in der Glykolyse bei 37°C ($200\text{ }\mu\text{Mol/g/h}$) als auch im Kurvenverlauf der Abkühlungsphase beobachtet werden. Daraus konnten wir den Schluß ziehen, daß unter diesen Bedingungen die Gly-

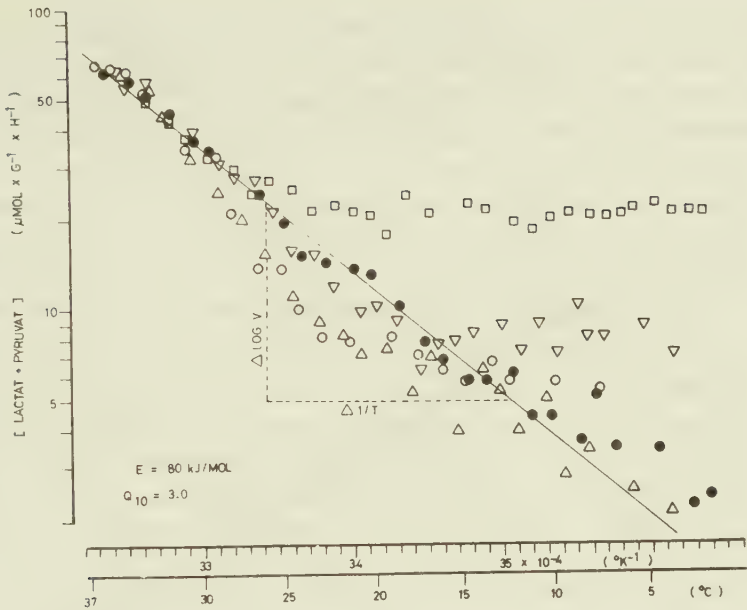


Abb. 3 Temperaturabhängigkeit der Glykolyse aus endogener Glucose

Isolierte Lebern von normal gefütterten Ratten wurden mit KH-Puffer im offenen System perfundiert. Aus der Produktion von Lactat und Pyruvat wurde die Geschwindigkeit der Glykolyse berechnet. Die Ergebnisse von 5 gleichartigen Experimenten ($\circ$, $\square$, ∇ , Δ , $\bullet$) wurden in der Phase der Abkühlung von 37°C auf $0,5^\circ\text{C}$ im ARRHENIUS-Diagramm dargestellt. (Ordinate: $\log V$, Abszisse: Reziprokwert der absoluten Temperatur.) Aus der Steigung der Geraden wurde der Q_{10} -Wert und die Aktivierungsenergie berechnet.

kolyse unter $V_{\max}$ -Bedingungen abgelaufen ist. Diese graphische Darstellung zeigt eine Linearität über den gesamten Temperaturbereich. Das mit Hilfe des ARRHENIUS-Diagramms berechnete E von 59 kJ/Mol mit dem dazugehörigen Q_{10} von 2,3 liegt deutlich unter dem der nicht unter $V_{\max}$ -Bedingungen abgelaufenen Glykolyse (Abb. 4).

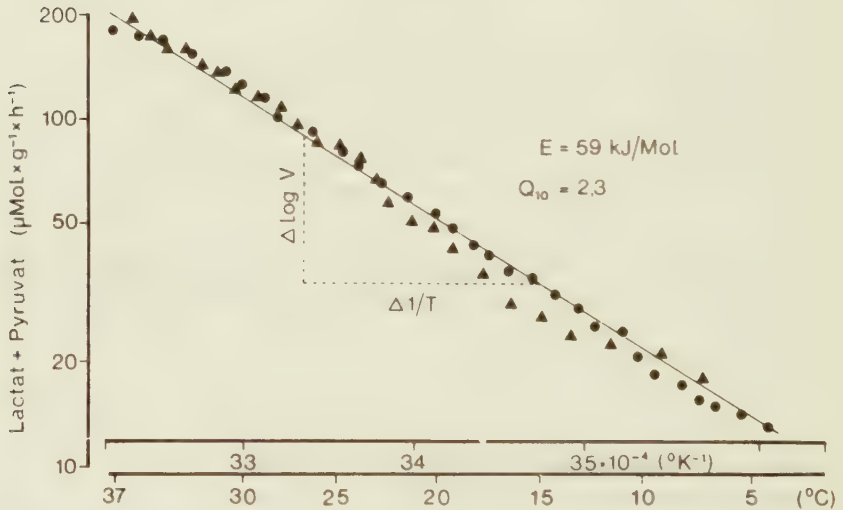


Abb. 4 Temperaturabhängigkeit der Glykolyse aus 46 mM Glucose
Isolierte Lebern von normal gefütterten Ratten wurden in Anwesenheit von 46 mM Glucose perfundiert. Aus der Produktion von Lactat und Pyruvat wurde die Geschwindigkeit der Glykolyse berechnet. Die Ergebnisse von 2 gleichartigen Experimenten (o, $\blacktriangle$) wurden im ARRHENIUS-Diagramm dargestellt. Weitere Einzelheiten siehe Legende in Abb. 3.

Bei der Fructolyse aus 10 mM Fructose wurde die Lactat- und Pyruvat-Produktion als Aktivität der Fructolyse unter diesen Bedingungen angenommen. Fructose wird in der Leber durch die Fructokinase und unter ATP-Verbrauch in Fructose-1-Phosphat umgewandelt. Durch die Aldolase B wird Fructose-1-Phosphat zu D-Glycerinaldehyd und Dihydroxyacetonphosphat gespalten. Die beiden Triosephosphate Dihydroxyacetonphosphat und Glycerinaldehyd-3-Phosphat-D-Glycerinaldehyd wird (wahrscheinlicher Hauptstoffwechselweg!) durch die Triokinase zu Glycerinaldehyd-3-Phosphat phosphoryliert - werden in die Glykolysekette eingeschleust (Harper et al., 1975).

Wir sehen, daß die Produktionsgeschwindigkeiten im beobachteten Temperaturbereich linear mit der Temperatur absinken bzw. wieder ansteigen. Die Fructolyse erreichte bei 37° C einen absoluten Betrag von 180 $\mu\text{Mol/g/h}$. Die Aktivierungsenergie der Fructolyse wurde zu 96 kJ/Mol berechnet, dazu ein Q_{10} von 4,0 (Abb. 5).

Bei der Glykogenolyse aus endogenem Glykogen, d. h. aus in der Leber gespeichertem Glykogen, konnten wir einen, der Glykolyse nahezu entsprechenden Verlauf in der graphischen Darstellung beobachten. Aus der Glucose, der Lactat- und der Pyruvat-Produktion berechneten wir die Produktionsgeschwindigkeit der Glykogenolyse. Die Ausgangsproduktion von Glucose, Lactat und Pyruvat betrug bei 37° C 85 $\mu\text{Mol/g/h}$. Der Verlauf in der Darstellung nach ARRHENIUS entsprach vollständig dem der Glykolyse. Er betrug somit der Glykolyse entsprechend 80 kJ/Mol, der Q_{10} 3,0. Der Abbau des Glykogens zu Glucose stellt daher nicht den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt dar (Abb. 6).

Als weiterer kataboler Prozeß wurde die Ketogenese aus der Fettsäure Octanoat untersucht. Wir perfundierten die isolierten Rattenlebern mit einer 0,5 mmolaren Octanoat-KH-Lösung. In einem Kontrollversuch gaben wir 1,5 mmolare Octanoat-KH-Lösung. Durch einen gleichartigen Versuchsverlauf konnte die maximale Stimulierung der Ketogenese bereits durch die 0,5 mM-Octanoat-KH-Lösung bewiesen werden. Die Keton-Körper β -Hydroxybutyrat und Acetoacetat wurden im enzymatischen Test bestimmt und die Geschwindigkeit der Substratproduktion in erster Näherung als Maß

für die Aktivität der Ketogenese angenommen. In diesem Experiment zeigen die Ergebnisse im ARRHENIUS-Diagramm keine Linearität über den gesamten Temperaturbereich. Wir erhielten 2 Geraden mit unterschiedlichen Steigungen. Die Produktion von Ketonkörpern betrug bei Perfusionsbeginn bei 37° C 60 $\mu\text{Mol/g/h}$.

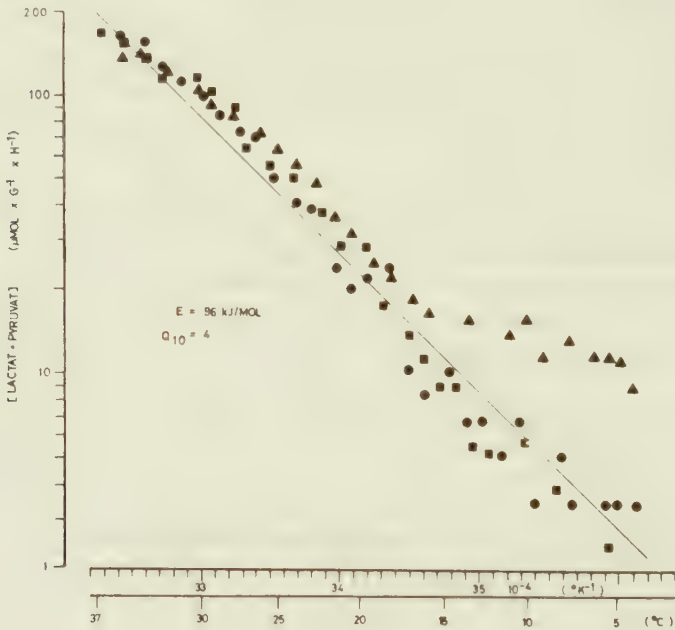


Abb. 5 Temperaturabhängigkeit der Fructolyse

Isolierte Lebern von 24 Stunden hungernden Ratten wurden in Anwesenheit von 10 mM Fructose perfundiert. Die Geschwindigkeit der Fructolyse wurde aus der Lactat- und Pyruvat-Produktion berechnet. Die Ergebnisse von 3 gleichartigen Experimenten ($\bullet$, $\blacksquare$, $\blacktriangle$) wurden im ARRHENIUS-Diagramm dargestellt. Weitere Einzelheiten siehe Legende zu Abb. 3

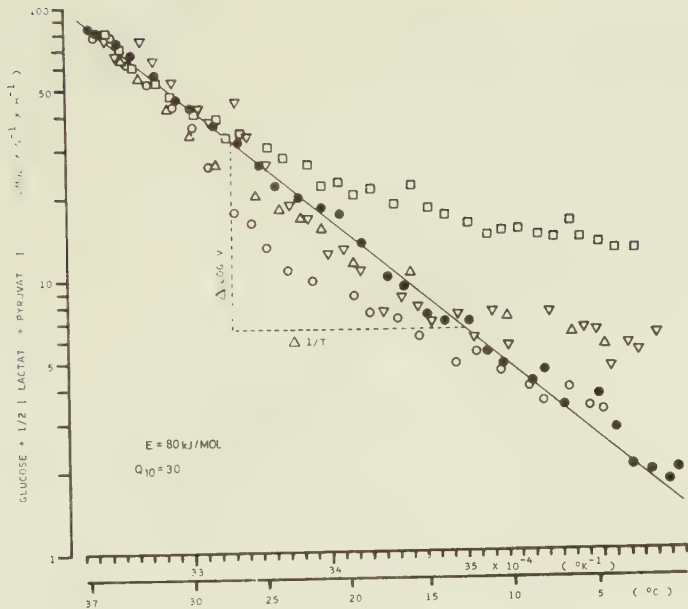


Abb. 6 Temperaturabhängigkeit der Glykogenolyse

Isolierte Lebern von normal gefütterten Ratten wurden mit KH-Puffer im offenen System perfundiert. Aus der Produktion von Glucose, Lactat und Pyruvat wurde die Geschwindigkeit der Glykogenolyse berechnet. Die Ergebnisse von 5 gleichartigen Experimenten ($\circ$, $\square$, Δ , ∇ , $\bullet$) wurden im ARRHENIUS-Diagramm dargestellt. Weitere Einzelheiten siehe Legende zu Abb. 3.

Im Temperaturbereich von 37°C bis 25°C konnte aus der Steigung der ARRHENIUS-Geraden ein E von 38 kJ/Mol und ein Q_{10} von $1,7$ ermittelt werden. Im Bereich von 25°C bis 1°C war die Temperaturabhängigkeit weit größer als bei den höheren Temperaturen,

E 105 kJ/Mol, Q_{10} 5,2 (Abb. 7). Zur Abschätzung der Aktivität des Citratzyklus perfundierten wir die Lebern mit Substraten, deren Endabbau im Citratzyklus erfolgt. Ihre Carboxylgruppen waren radioaktiv markiert. Wir benützten Octanoat-1- ^{14}C und Pyruvat-3- ^{14}C .

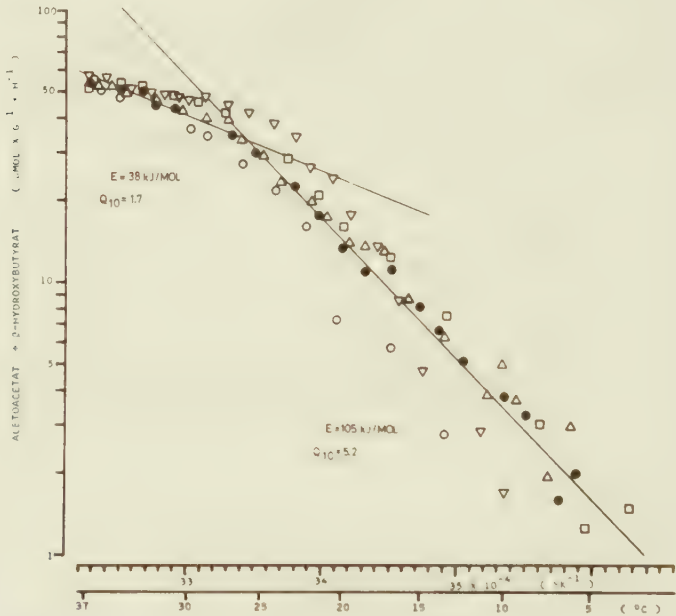


Abb. 7 Temperaturabhängigkeit der Ketogenese

Isolierte Lebern von normal gefütterten Ratten wurden in Anwesenheit von 0,5 mM Octanoat perfundiert. Aus der Produktion von Acetoacetat und β -Hydroxybutyrat wurde die Geschwindigkeit der Ketogenese berechnet. Die Ergebnisse von 5 gleichartigen Experimenten ($\circ$, $\square$, Δ , ∇ , $\bullet$) wurden im ARRHENIUS-Diagramm dargestellt. Weitere Einzelheiten siehe Legende zu Abb. 3.

Die $^{14}\text{CO}_2$ -Produktion aus Octanoat zeigte einen, der Ketogenese entsprechenden biphasischen Verlauf, der im gleichen Temperaturmeßpunkt einen "Knick" aufwies, wie er zuvor bei der Ketogenese beobachtet werden konnte. Der Bereich 37°C bis 25°C zeigte allerdings einen geringfügig abweichenden Geradenverlauf mit einem E von 46 kJ/Mol und einem Q_{10} von $1,9$. Zwischen 25°C und 1°C dagegen konnten wir genau dieselbe Größe der Aktivierungsenergie, nämlich zu 105 kJ/Mol und einen Q_{10} zu $5,2$ berechnen. Insgesamt kann man durch den Vergleich der Ketogenese und der $^{14}\text{CO}_2$ -Produktion aus Octanoat auf einen gemeinsamen geschwindigkeitsbestimmenden Schritt dieser beiden Reaktionsfolgen schließen (Abb. 8, 9).

In weiteren Versuchen wurde mit $1,2\text{ mM}$ Pyruvat- $3\text{-}^{14}\text{C}$ perfundiert. Das markierte Kohlenstoffatom erscheint im Acetyl-CoA in 1-Stellung und erscheint nach zweimaligem Durchgang durch den Citratzyklus als markiertes C-Atom im $^{14}\text{CO}_2$. Die Geschwindigkeit der $^{14}\text{CO}_2$ -Produktion vermittelt uns Hinweise auf die Aktivität des Citratzyklus. Wir beobachteten eine Ausgangsproduktion bei 37°C von $15\text{ }\mu\text{Mol/g/h}$ und einen linearen Kurvenverlauf im ARRHENIUS-Diagramm. Die Aktivierungsenergie E betrug 59 kJ/Mol mit einem dazugehörigen Q_{10} von $2,3$ (Abb. 10). Die Temperaturabhängigkeit der Pyruvatoxydation konnten wir durch Verwendung von Pyruvat- $1\text{-}^{14}\text{C}$ untersuchen. Mit Hilfe eines Multienzymkomplexes wird Pyruvat in 1-Stellung decarboxyliert und der Acetylrest an CoA gebunden. Da wir Pyruvat- $1\text{-}^{14}\text{C}$ verwendeten, konnten wir die Aktivität der PDH in erster Näherung durch die Geschwindigkeit der $^{14}\text{CO}_2$ -Produktion bestimmen. Bei einer Basis-Produktion bei 37°C von $20\text{ }\mu\text{Mol/g/h}$ bei $1,2\text{ mM}$ Pyruvat und $110\text{ }\mu\text{Mol/g/h}$ bei $5,5\text{ mM}$ Pyruvat sah man im ARRHENIUS-Diagramm einen linearen Verlauf zwischen 37°C und 1°C . E wurde zu 80 kJ/Mol berechnet, der Q_{10} zu $3,0$ (Abb. 11).

Die untersuchten katabolen Stoffwechselprozesse, die von uns zur Bestimmung von Aktivierungsenergie und Q_{10} in der semilogarithmischen Darstellung nach ARRHENIUS aufgetragen wurden, zeigten sowohl einen linearen Verlauf über den gesamten Beobachtungsreich, als auch Linearität nur in einzelnen Abschnitten. Nach

sogenannten "Knickpunkten" konnten wir dann in den tieferen Temperaturbereichen durchwegs eine höhere Temperaturabhängigkeit aufzeigen. Die Aktivierungsenergien lagen zwischen 38 kJ/Mol und 105 kJ/Mol, die dazugehörigen Q_{10} -Werte zwischen 1,7 und 5,2.

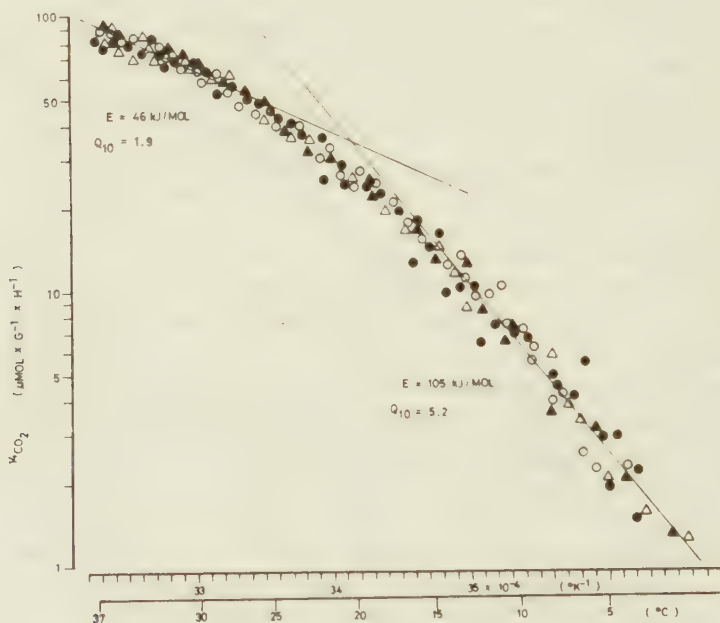


Abb. 8 Temperaturabhängigkeit der CO_2 -Produktion aus Octanoat

Isolierte Lebern von normal gefütterten Ratten wurden in Anwesenheit von 0,5 mM Octanoat- $1\text{-}^{14}\text{C}$ (spezifische Aktivität: 0,01 $\mu\text{Curie}/\mu\text{Mol}$) perfundiert. Das Perfusat wurde in 2-Minuten-Fractionen gesammelt. CO_2 wurde durch Ansäuerung ausgetrieben und in Phenyläthylamin aufgefangen. Aus der durch Flüssigkeits-Szintillations-Spektrometrie im CO_2 gefundenen Radioaktivität wurde mit Hilfe der spezifischen Aktivität des Octanoats die Geschwindigkeit der $^{14}\text{CO}_2$ -Produktion berechnet. Die Ergebnisse von zwei gleichartigen Experimenten wurden während der Abkühlung (○, △) und des Wiedererwärmens (●, ▲) im ARRHENIUS-Diagramm dargestellt. Weitere Einzelheiten siehe Legende Abb. 3.

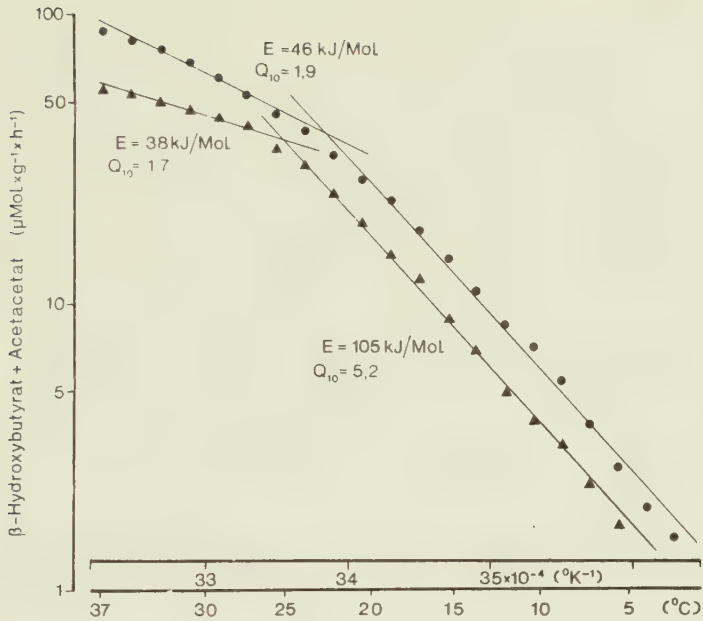


Abb. 9 Temperaturabhängigkeit der Ketogenese und der CO_2 -Produktion

Die Mittelwerte aus 4 gleichartigen Experimenten wurden im ARRHENIUS-Diagramm dargestellt. Ketogenese ($\blacktriangle$), $^{14}\text{CO}_2$ -Produktion ($\bullet$). Weitere Einzelheiten siehe Legendenden zu Abb. 3, 7, 8.

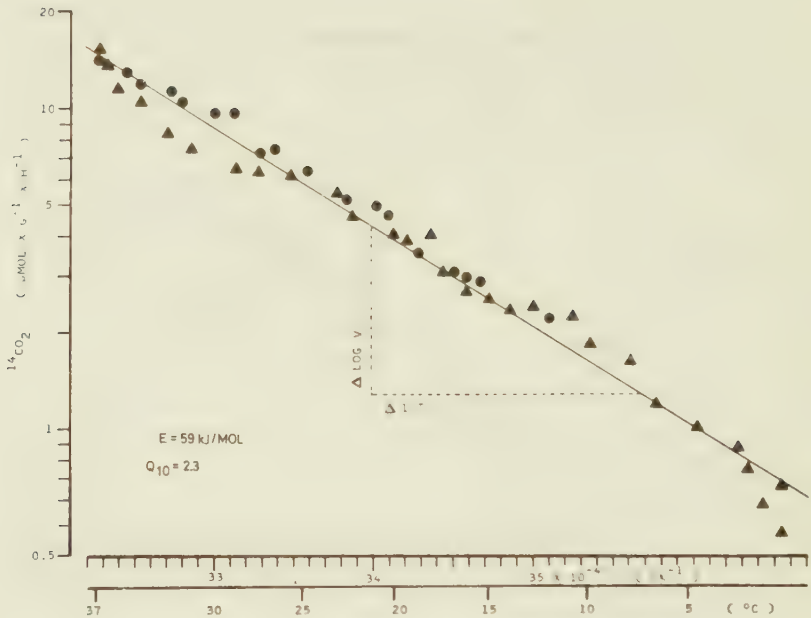


Abb. 10 Temperaturabhängigkeit der CO_2 -Produktion aus Pyruvat- $3\text{-}^{14}\text{C}$

Isolierte Lebern von normal gefütterten Ratten wurden in Anwesenheit von $1,2 \text{ mM}$ Pyruvat- $3\text{-}^{14}\text{C}$ (spezifische Aktivität: $0,005 \mu\text{Curie}/\mu\text{Mol}$) perfundiert. Die Ergebnisse von 2 gleichartigen Experimenten ($\bullet, \blacktriangle$) wurden im ARRHENIUS-Diagramm dargestellt. Weitere Einzelheiten siehe Legende zu Abb. 3 und Abb. 8.

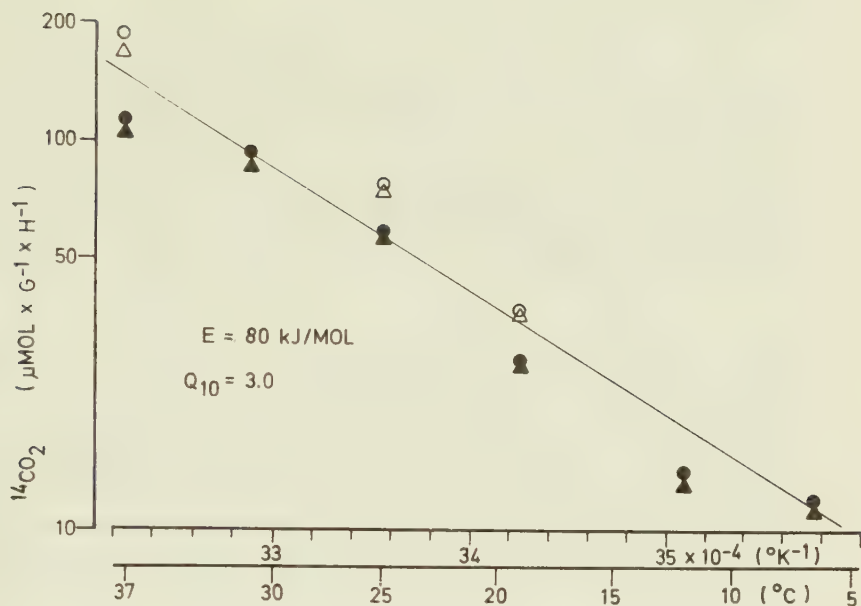


Abb. 11 Temperaturabhängigkeit der Pyruvat-Oxydation

Isolierte Lebern von normal gefütterten Ratten wurden in Anwesenheit von 5,5 mM Pyruvat-1- ^{14}C perfundiert. Die Ergebnisse eines Experimentes wurden während der Abkühlung ($\bullet, \blacktriangle$) und der Wiedererwärmung ($\circ, \triangle$) - bei verschiedenen Temperaturplateaus - im ARRHENIUS-Diagramm dargestellt. (Bei den Temperaturplateaus wurden Doppelbestimmungen durchgeführt.) Weitere Einzelheiten siehe Legende zu Abb. 3 und Abb. 8.

4.4.2. Anabole Stoffwechselwege

Die Hauptsubstrate für die Gluconeogenese sind die glucogenen Aminosäuren, Lactat und Glycerin. Bis auf drei Reaktionen (Pyruvat-Kinase-Reaktion, Phosphofructo-Kinase-Reaktion, Hexokinase-Reaktion) stellt die Gluconeogenese eine Umkehr der Glykolyse dar. Diese Reaktionen müssen durch andere enzymatische Reaktionen umgangen werden, die allerdings sehr viel Energie verbrauchen, nämlich 6 Mol ATP pro Mol gebildete Glucose.

Abb. 12 zeigt ein Experiment, bei dem die Leber einer 24 Stunden hungernden Ratte aus Lactat und Pyruvat (4 mM plus 0,5 mM) Glucose synthetisierte. Bei dieser Substratkonzentration ist die Geschwindigkeit der Gluconeogenese nahezu maximal (Scholz et al., 1973). Auch in diesem Experiment zeigen die Ergebnisse im ARRHENIUS-Diagramm keine Linearität über den gesamten Temperaturbereich. Wir erhielten mehrere Geraden mit verschiedenen Steigungen:

1. Bereich: $37^{\circ}\text{C} - 20^{\circ}\text{C}$ $E = 50\text{ kJ/Mol}$, $Q_{10} = 2,0$
2. Bereich: $20^{\circ}\text{C} - 10^{\circ}\text{C}$ $E = 80\text{ kJ/Mol}$, $Q_{10} = 3,0$
3. Bereich: $10^{\circ}\text{C} - 1^{\circ}\text{C}$ $E = 150\text{ kJ/Mol}$, $Q_{10} = 8,5$

Die Temperaturabhängigkeit der Gluconeogenese ist, wie aus der Aufstellung ersichtlich wird, demnach bei den niedrigen Temperaturen weit größer als bei den hohen. Die geringe Temperaturabhängigkeit der Glucoseproduktion im Bereich zwischen 37°C und 20°C war in den ersten Experimenten, in denen wir mit der halben Substratkonzentration arbeiteten (2 mM Lactat und 0,25 mM Pyruvat) noch deutlicher ausgeprägt (Abb. 13). Wir ermittelten 2 Geraden, die erste im Intervall von 37°C bis 19°C , die zweite im Intervall von 19°C bis 1°C . Im ersten Fall berechneten wir die Aktivierungsenergie zu 42 kJ/Mol ($Q_{10} = 1,8$), im zweiten zu 138 kJ/Mol ($Q_{10} = 6,6$). In diesen Experimenten lief die Gluconeogenese nicht bei maximaler Sättigung ab, wir befanden uns im Bereich submaximaler Reaktionsgeschwindigkeit.

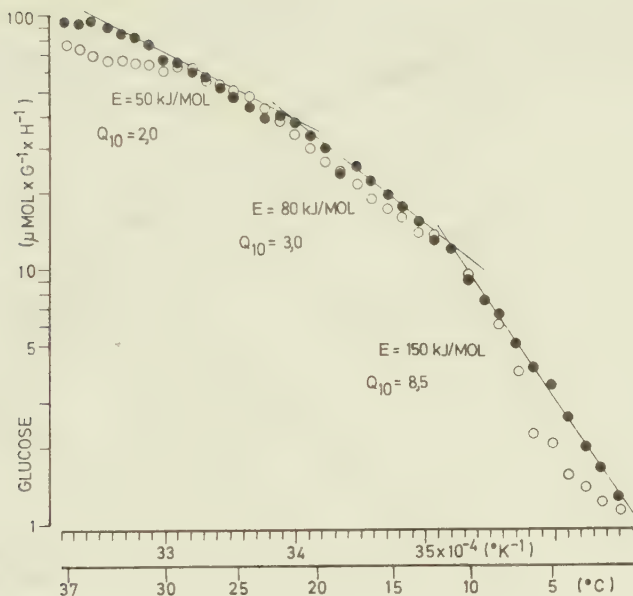


Abb. 12 Temperaturabhängigkeit der Gluconeogenese

Die isolierte Leber einer 24 Stunden hungernden Ratte wurde in Anwesenheit von 4 mM Lactat und 0,5 mM Pyruvat perfundiert. Die Geschwindigkeiten der Glucoseproduktion in der Phase der Abkühlung von 37° C auf 0,5° C (●) und der anschließenden Wiedererwärmung auf 37° C (○) wurden im ARRHENIUS-Diagramm dargestellt. Weitere Einzelheiten siehe Legende zu Abb. 3.

Auch die Gluconeogenese aus Alanin wurde von uns zunächst im Bereich ungenügender Absättigung, d. h. bei nicht maximaler Reaktionsgeschwindigkeit durchgeführt. Wir perfundierten die Lebern von gehungerten Ratten mit 3 mM, 9 mM und 18 mM Alanin. Während sich die Steigung der Geraden im ARRHENIUS-Diagramm bei den ver-

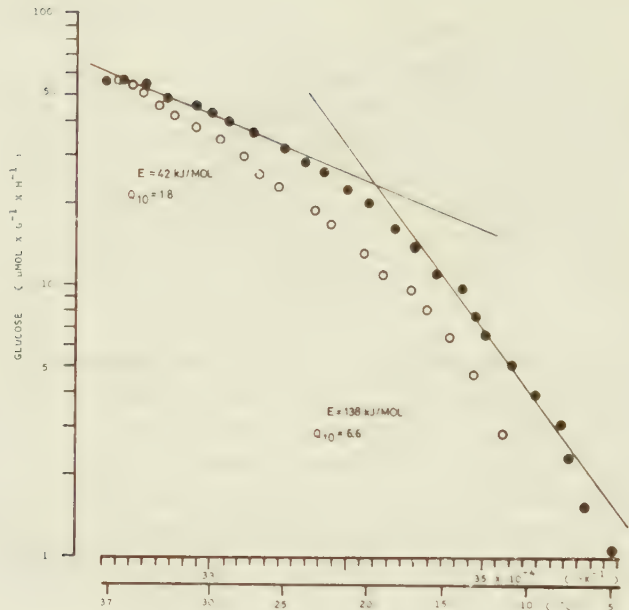


Abb. 13 Temperaturabhängigkeit der Gluconeogenese aus Lactat und Pyruvat

Die isolierte Leber einer 24 Stunden hungernden Ratte wurde in Anwesenheit von 2 mM Lactat und 0,25 mM Pyruvat perfundiert. Die Geschwindigkeiten der Glucoseproduktion in der Phase der Abkühlung von 37° C auf 0,5° C (●) und der anschließenden Wiedererwärmung auf 37° C (○) wurden im ARRHENIUS-Diagramm dargestellt. Weitere Einzelheiten siehe Legende zu Abb. 3.

schiedenen Konzentrationen nicht änderte. (Man konnte E zu 84 kJ/Mol und den Q_{10} zu 3,2 berechnen.) So waren zumindest zwischen 3 mM und 9 mM Alanin deutliche Unterschiede in der Basis-Glucose-Produktion bei 37° C zu beobachten (9 mM - 20 $\mu\text{Mol/g/h}$,

3 mM - 16 $\mu\text{Mol/g/h}$). Erst bei den tieferen Temperaturen (bei 25° C), bei denen sich die hypotherme Stoffwechselverlangsamung zeigte, war kein Unterschied mehr in der absoluten Menge der Glucoseproduktion (Abb. 14, 15).

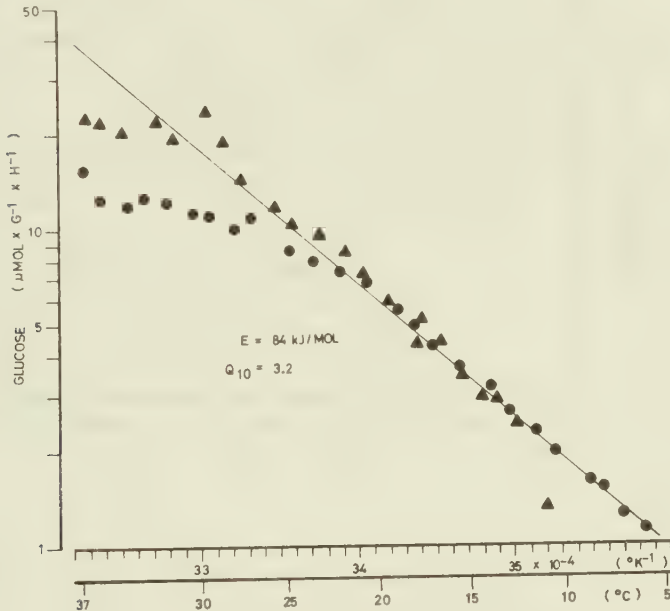


Abb. 14 Temperaturabhängigkeit der Gluconeogenese aus Alanin

Isolierte Lebern von 24 Stunden hungernden Ratten wurden in Anwesenheit von 3 mM (●) und 9 mM (▲) Alanin perfundiert. Die Geschwindigkeit der Glucoseproduktion wurde im ARRHENIUS-Diagramm dargestellt. Weitere Einzelheiten siehe Legende zu Abb. 3.

Die Gluconeogenese aus 10 mM Fructose zeigte eine Basisproduktion bei 37° C von 110 $\mu\text{Mol/g/h}$. Wir konnten im tieferen Temperaturbereich eine außerordentlich große Temperaturabhängigkeit bestimmen. Die Aktivierungsenergie 42 kJ/Mol ($Q_{10} = 1,8$) fanden

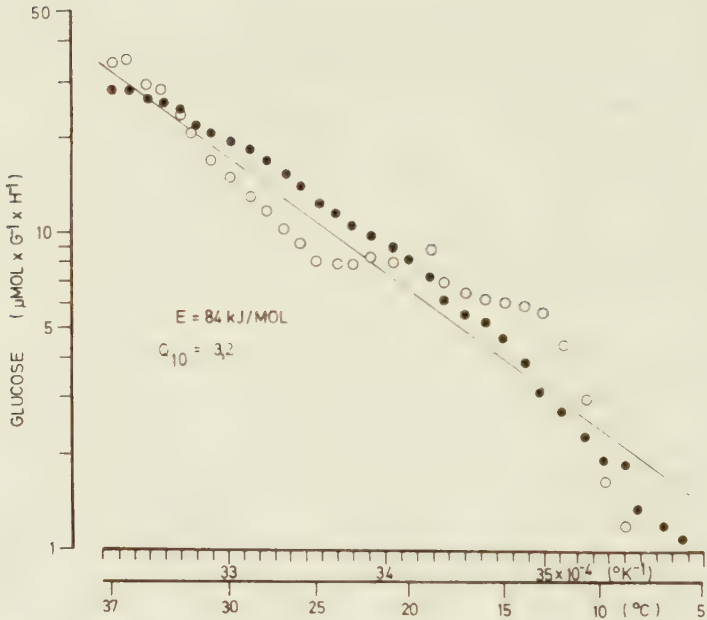


Abb. 15 Temperaturabhängigkeit der Gluconeogenese aus Alanin

Die isolierte Leber von einer 24 Stunden hungernden Ratte wurde in Anwesenheit von 18 mM Alanin perfundiert. Die Geschwindigkeiten der Glucoseproduktion in der Phase der Abkühlung von 37° C auf 0,5° C (●) und der anschließenden Wiedererwärmung auf 37° C (o) wurden im ARRHENIUS-Diagramm dargestellt. Weitere Einzelheiten siehe Legende zu Abb. 3.

wir im Intervall 37° C bis 25° C, im Intervall 25° C bis 1° C beobachteten wir die höchste Aktivierungsenergie, nämlich 216 kJ/Mol ($Q_{10} = 25$) (Abb. 16).

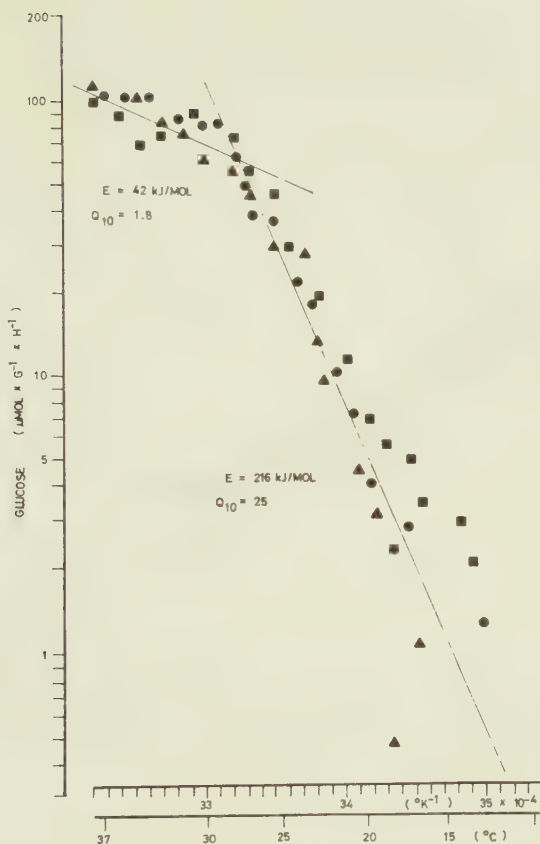


Abb. 16 Temperaturabhängigkeit der Gluconeogenese aus Fructose

Isolierte Lebern von 24 Stunden hungernden Ratten wurden in Anwesenheit von 10 mM Fructose perfundiert. Die Geschwindigkeit der Glucoseproduktion bei 3 gleichartigen Experimenten ($\blacksquare$, $\bullet$, $\blacktriangle$) wurde im ARRHENIUS-Diagramm dargestellt. Weitere Einzelheiten siehe Legende zu Abb. 3.

Experimente, in denen wir die Harnstoffsynthese aus NH_3 (unter Zugabe von Ornithin) untersuchten, brachten schlecht reproduzierbare und wenig verwertbare Ergebnisse. Nur die Harnstoffsynthese aus 9 mM Alanin zeigte ein auswertbares Ergebnis ($E = 59 \text{ kJ/Mol}$, $Q_{10} = 2,3$) (Abb. 17).

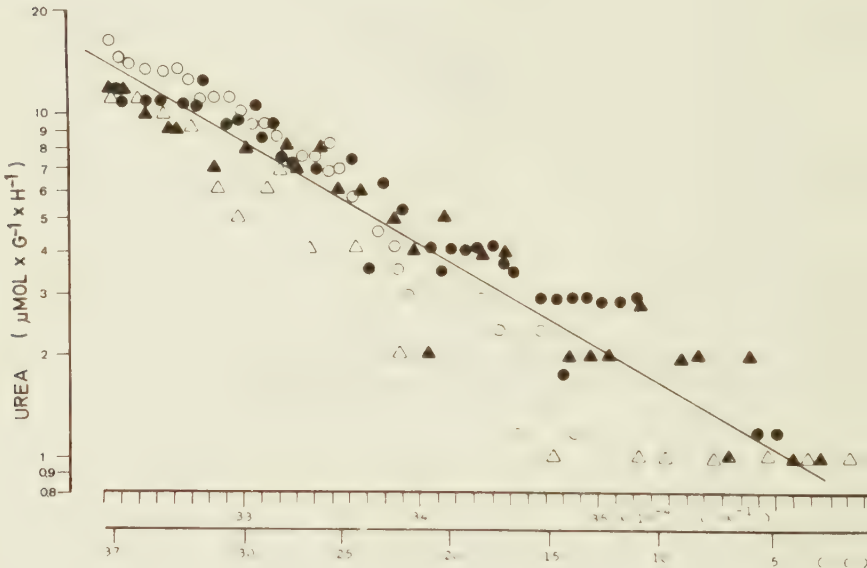


Abb. 17 Temperaturabhängigkeit der Harnstoffsynthese

Isolierte Lebern von 24 Stunden hungernden Ratten wurden in Anwesenheit von 9 mM Alanin perfundiert. Die Produktion von Harnstoff in zwei gleichartigen Experimenten wurde in der Phase der Abkühlung (▲, ●) von 37° C auf 0,5° C und der anschließenden Wiedererwärmung (Δ, o) auf 37° C im ARRHENIUS-Diagramm dargestellt. Weitere Einzelheiten siehe Legende zu Abb. 3.

Tabelle 2 Temperaturabhängigkeit von katabolen und anabolen Prozessen in der perfundierten Rattenleber

Prozeß	Substrat	gemessene Parameter	$\mu\text{Mol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ bei 37° C	Temperaturbereich	E (kJ·Mol ⁻¹)	Q ₁₀	Zahl der Versuche
Katabole Prozesse							
<u>Glycolyse</u>	endogen Glucose (46 mM)	Lactat + Pyruvat Lactat + Pyruvat	70 200	37° - 1° 37° - 1°	80 59	3,0 2,3	15 2
<u>Fructolyse</u>	Fructose (10 mM)	Lactat + Pyruvat	180	37° - 1°	96	4,0	3
<u>Glycogenolyse</u>	endogen	Glucose + 1/2 (Lactat + Pyruvat)	85	37° - 1°	80	3,0	15
<u>Ketogenese</u>	Octanoat (0,5 mM)	β-OH-Butyrat + Acetacetat	60	37° - 25° 25° - 1°	38 105	1,7 5,2	8
<u>CO₂-Produktion</u>	Octanoat-1- ¹⁴ C (0,5 mM)	¹⁴ CO ₂	85	37° - 25° 25° - 1°	46 105	1,9 5,2	2
	Pyruvat-3- ¹⁴ C (1,2 mM)	¹⁴ CO ₂	15	37° - 1°	59	2,3	2
	Pyruvat-1- ¹⁴ C (1,2 mM)	¹⁴ CO ₂	20	37° - 1°	90	3,0	2
<u>Pyruvat Oxydation</u>	Pyruvat-1- ¹⁴ C (5,5 mM)	¹⁴ CO ₂	110	37° - 1°	80	3,0	1
Anabole Prozesse							
<u>Gluconeogenese</u>	Lactat + Pyruvat (4 mM + 0,5 mM)	Glucose	105	37° - 20° 20° - 10° 10° - 1°	50 80 150	2,0 3,0 8,5	2
	Lactat + Pyruvat	Glucose	55	37° - 20°	42	1,8	4

Die anabolen Stoffwechselwege zeigen in ihrem Verhalten gegenüber Temperaturänderungen eine größere Abhängigkeit als die untersuchten katabolen Wege. Die Aktivierungsenergien lagen im gesamten Temperaturbereich zwischen 42 kJ/Mol ($Q_{10} = 1,8$) und 216 kJ/Mol ($Q_{10} = 25$).

Tabelle 2 faßt die Basisproduktionen bei 37° C, die Q_{10} -Werte und die Aktivierungsenergien aller untersuchten Stoffwechselgrößen zusammen.

4.5. Vitalitätsparameter

Experimente mit verschiedenen langen hypothermen Phasen unserer Lebern unter verschiedenen Bedingungen sollten uns Einblicke in die Reversibilität der untersuchten Stoffwechselleistungen vermitteln. Als weitere Kriterien der Organvitalität untersuchten wir Enzymverluste und Änderungen des pH-Wertes im ausfließenden Perfusat.

4.5.1. Langzeitperfusionen

In diesen Experimenten wurden die Lebern entweder mit dem normalen Durchflußvolumen von 3 - 4 ml/min/g Leber durchströmt, bei den 5 Stunden dauernden Experimenten, und mit reduziertem Flow von 1 ml/min/g Leber, bei den 24 Stunden andauernden Experimenten. Tabelle 3 zeigt die Ergebnisse dieser Perfusionsversuche, bei denen sowohl katabole (Glykolyse, Glykogenolyse, Ketogenese) als auch anabole (Gluconeogenese, Harnstoffsynthese), Funktionen der Zelle beobachtet wurden. Wir sahen durchwegs eine Reversibilität dieser Funktionen, d. h. daß die Ausgangswerte bei 37° C wieder erreicht wurden.

4.5.2. Kältelagerung

Die Lebern wurden für 5 Stunden und für 48 Stunden im Kältebad aufbewahrt. Die Lebern konnten auch nach diesem perfusionslosen Intervall nach Wiedererwärmen und Reperfusion die Basisproduktion der untersuchten katabolen Stoffwechselwege bei 37° C wieder erreichen (Tab. 3).

4.5.3. Intermittierende Schwerkraftperfusion

In diesem Experiment wurde die Leber zuerst bei 37° C perfundiert und nach ca. 20 Minuten mit einem auf 4° C abgekühlten Perfusat durchströmt. Dann wurde die gesamte Apparatur in den 4° C temperierten Kühlraum gebracht. Die Leber wurde alle 4 Stunden bei einem Druck von 20 cm Wassersäule mit K-H durchströmt. Die Leber zeigte zu Beginn der Kältephase eine akute Schwellung und massive Eiweißverluste. Wir beobachteten die Glykolyse und die Glykogenolyse. Beide Parameter kamen nach sofortigem Wiedererwärmen auf 37° C ihren Ausgangswerten sehr nahe (Tab. 3).

4.5.4. Bestimmung der Enzymverluste

Wir registrierten in 6 Versuchen die Aktivitäten folgender Enzyme im ausfließenden Perfusat: die der LDH, der GPT, GldH und der GOT. Wichtig für die Interpretation der gemessenen Aktivitäten ist außerdem die Kenntnis von der Verteilung der Enzyme in den einzelnen Kompartimenten der Zelle. Die GPT + LDH sind nur im Cytosol zu finden, die GldH nur im Mitochondrium. Die GOT ist in beiden Räumen anzutreffen. Um die schwer beurteilbaren Angaben der Enzymaktivitäten in mU/ml verständlicher zu machen, haben wir bei der LDH die Aktivitäten im ml auf die gesamte Enzymaktivität in 1g Leber bezogen.

Die LDH zeigte von Beginn der Perfusion bis zum Ende der Abkühlphase einen kontinuierlichen Abfall der ausgeschütteten Aktivität von 1 % - 0,2 %/g Leber/h auf unter 0,1 %/g Leber/h. Erst

Tab. 3 Metabolit-Konzentrationen bei Langzeitexperimenten

Dargestellt sind die Metabolitkonzentrationen von katabolen und anabolen Stoffwechselprozessen bei 37° C bei Beginn und am Ende der Versuche nach unterschiedlicher Konservierungszeit und unterschiedlicher Konservierungsmethode.

Konservierungsmethode	Substrat	Prozeß	gemessene Parameter	$\mu\text{Mol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ bei 37° C	Beginn	Ende	Zahl der Versuche
5stündige Perfusionen mit normalem Flow	endogen	Glykolyse	Lactat + Pyruvat	51	52	15	
		Glykokeno- lyse	Glucose + 1/2 (Lactat + Pyruvat)	85	90		
	Octanoat (0,5 mM)	Ketogenese	Acetoacetat + β -OH-Butyrat	62	66	8	
24stündige Perfusionen mit reduziertem Flow	Octanoat (0,5 mM)	Ketogenese	Aketoacetat + β -OH-Butyrat	35	40	2	
	Alanin (3mM)	Gluconeo- genese	Glucose	11	7		
	Lactat + Pyruvat (2 mM + 0,25 mM)	Gluconeo- genese	Glucose	62	83		
5stündige Lagerung ohne Perfusion	Octanoat (0,5 mM)	Ketogenese	Acetoacetat + β -OH-Butyrat	58	74	2	
48stündige Lagerung ohne Perfusion	endogen	Glykolyse	Lactat + Pyruvat	25	17	1	
		Glykogeno- lyse	Glucose + 1/2 (Lactat + Pyruvat)	112	115		
	Octanoat (0,5 mM)	Ketogenese	Acetoacetat + β -OH-Butyrat	37	47		
24stündige intermittie- rende Schwerkraftper- fusion	endogen	Glykolyse	Lactat + Pyruvat	37	27	1	
		Glykogenolyse	Glucose + 1/2 (Lactat + Pyruvat)	98	100		

mit andauernder Hypothermie sahen wir erneute Anstiege, bis 0,3 %/g Leber/h und maximal (in zwei Fällen) bis 2 %/g Leber/h. Die GPT und die GOT konnten nur in einigen der entnommenen Perfusatsproben gemessen werden. Die GOT zeigte von Perfusionsbeginn bis zum Ende der Abkühlphase sehr geringe Aktivitäten im ausgetrönten Perfusat. Beim Wiedererwärmen stieg auch der Enzymverlust an. Die GLDH zeigte mit der Abkühlung einen Abfall der Aktivität von 5 - 1,5 mU/ml auf nahezu 0 mU/ml, um mit der Wiedererwärmung auf 10 mU/ml (maximal auf 24 mU/ml) anzusteigen (Abb. 18).

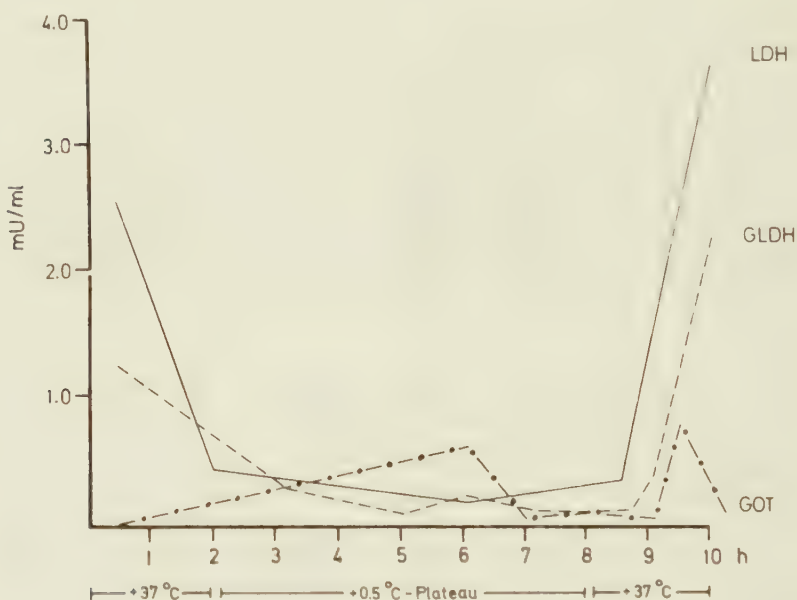


Abb. 18 Enzymverluste der Leberzellen

Die isolierte Leber einer normal gefütterten Ratte wurde mit KH-Puffer perfundiert. Die Enzymverluste (LDH, GOT, GLDH) der Leberzelle während eines Perfusionszyklus mit Abkühlen, Kälteplateau (5 h bei 0,5° C) und Wiedererwärmen auf 37° C wurde graphisch dargestellt. Bestimmung der Enzyme im optisch enzymatischen Test. Abszisse: Zeit in Stunden; Ordinate: mU/ml

4.5.5. pH-Messungen

Die pH-Wert-Veränderungen wurden in 5 Versuchen in der Abkühlungs- und in der Wiedererwärmungsphase pro 5° C Temperaturänderung bestimmt. Wir konnten die erwartete Ansäuerung des Perfusates in der Hypothermie in keinem der beobachteten Fälle nachweisen. Versuch 32 zeigte z. B. bei 37° C einen pH von 7,36 und bei 1° C einen pH-Wert von 7,67.

Dies war der Versuch mit der größten pH-Differenz. Im übrigen registrierten wir zumeist nur eine Änderung um 1/10 auf der pH-Skala, eine Änderung von z. B. 7,35 zu 7,45, aber immer eine Wendung zum basischen Bereich, mit der Abnahme der Temperatur (Tab. 4).

Tab. 4 Temperaturabhängigkeit des pH-Wertes im ausfließenden Perfusat

Isolierte Lebern von normal gefütterten Ratten wurden mit KH-Puffer perfundiert. Der pH-Wert wurde im ausfließenden Perfusat mit der pH-Elektrode bestimmt

Aufzeichnung des pH-Wertes während eines von 5 gleichartigen Versuchen.

Ausgangswert bei	37° C	pH	7,40
off-Phase	37° C		7,32
	30° C		7,32
	25° C		7,39
	20° C		7,40
	15° C		7,41
	10° C		7,42
	5° C		7,42
	1° C		7,45
on-Phase	1° C		7,43
	5° C		7,43
	10° C		7,43
	15° C		7,43
	20° C		7,43
	25° C		7,42
	30° C		7,40
	37° C		7,36
nach 25 min Perf.	37° C		7,43

5. DISKUSSION

5.1. Probleme der Hypothermie

Mit Hilfe der Hypothermie gelingt es physikalisch die Stoffwechselgeschwindigkeit zu senken. Pharmakologisch kann das durch sogenannte "Stoffwechselinhibitoren" geschehen. Die Hypothermie bedeutet einen unphysiologischen Zustand für ein Organ, verlängert allerdings durch Reduktion des Bau- und Betriebsstoffwechsels dessen Vitalität. Da die Viskosität eines erythrozytenhaltigen Mediums mit dem Absinken der Temperatur zunimmt und da bei tiefer Temperatur das Hämoglobin den gebundenen Sauerstoff erschwert abgibt, erscheint es sinnvoll, die Perfusion hämoglobinfrei durchzuführen (Bigelow, 1963; Callaghan et al., 1961).

Wichtig sind die Elektrolytveränderungen, die während der Kältephasen auftreten können. Brendel et al. (1966) beschreibt in der Hypothermie eine Kälte-Schwellung der Leber, hervorgerufen durch eine Zunahme des Na^+ - und H_2O -Gehaltes der Leberzelle, bei gleichzeitigem K^+ -Verlust. Die Richtung und das Ausmaß der Elektrolytveränderungen zeigten nicht nur eine eindeutige Abhängigkeit von der Temperatur, sondern auch von der Dauer der Hypothermie. Es wurde verschiedentlich beschrieben (Lambotte et al., 1969, 1973), daß bei Temperaturen unterhalb von 20°C der passive Ionenflux den aktiven Transport übertrifft, ohne daß der aktive Transport gänzlich unterbunden wird. Nach Reuben et al. (1966) wird die Temperaturhemmung der aktiven Transportgeschwindigkeiten auf verschiedenen Wegen verursacht:

- a) Physikalisch über eine Änderung der Membraneigenschaften, z. B. einer selektiven Abnahme der Ionenpermeabilität oder des Membranwiderstandes.
- b) Chemisch über eine Verlangsamung der Carrier Vermittlung bzw. dessen "turnover", oder der erforderlichen energetisch-metabolischen Vorgänge.

Die Stoffwechselverlangsamung nimmt in der tiefen Hypothermie ganz entscheidende Ausmaße an. So beobachtete Humphries (1967),

daß der Metabolismus der Zelle mit abfallender Temperatur linear absinkt und bei 4° C weniger als 5 % des normalen Metabolismus ausmacht. Derselbe Autor verweist ausdrücklich auf die vielen Probleme der hypothermen Organperfusion hin:

- a) Gewebsschwellungen,
- b) Vasokonstriktionen,
- c) verstopfte Capillaren.

5.2. Die Aktivierungsenergie und der Q_{10}

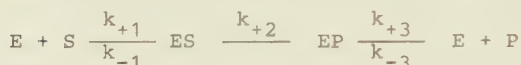
Aus der Steigung der mit Hilfe des ARRHENIUS-Diagramms ermittelten Geraden (d. h. $\log V / \frac{1}{T}$) wurden folgende Größen berechnet:

- a) Die Aktivierungsenergie, $E = R \cdot 2,3 \cdot \log V / \frac{1}{T}$,
- b) der Q_{10} .

Während die Berechnung des Q_{10} -Wertes unproblematisch ist und hinsichtlich der Interpretation keine Schwierigkeiten bereitet, stellt uns sowohl die Berechnung als auch die Interpretation der Aktivierungsenergie E vor große Probleme. Es muß nämlich einschränkend gesagt werden, daß in der von ARRHENIUS angegebenen Gleichung ($E = R \cdot \ln K / \frac{1}{T}$) die Geschwindigkeitskonstante einer Reaktion und nicht die Geschwindigkeit selbst erscheint. Da die maximale Geschwindigkeit jedoch proportional der Geschwindigkeitskonstanten ist, wurden die Perfusionsexperimente unter Bedingungen durchgeführt, bei denen für die untersuchten Prozesse nahezu $V_{\max}$ -Bedingungen vorlagen. Dies scheint für den Über-alles-Prozeß, z. B. der Gluconeogenese oder der Ketogenese, gegeben zu sein. (Der Nachweis dieser Behauptung wurde durch Kontrollversuche erbracht, in denen das Perfusionsmedium mit erhöhten Substratkonzentrationen versehen war und in denen sich danach identische Diagramme nach ARRHENIUS ergaben.) Daraus kann jedoch noch nicht abgeleitet werden, daß für den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt innerhalb der Gesamtreaktion ebenfalls $V_{\max}$ -Bedingungen vorlagen. Die berechneten Aktivierungsenergien müssen deshalb mit gewissen Vorbehalten angesehen werden, die Reaktionsfolgen bedürfen somit weiterer intensiverer Untersuchungen. Wir hatten nämlich nur die Möglichkeit, die Resultanten von komplexen Stoffwechselprozessen als Reaktionsgeschwindigkeit zu messen und nicht die Geschwindigkeiten der einzelnen Reaktionen.

5.3. Die Temperaturabhängigkeit der enzymatischen Reaktion

Man kann für die enzymatische Reaktion folgende vereinfachende Reaktionsgleichung aufstellen:



E (Enzym)

S (Substrat)

k (Reaktionskonstante)

P (Produkt)

Wird nun die Reaktionsgeschwindigkeit durch Variation der Temperatur verändert, so erkennt man, daß dies bei niedrigen Substratkonzentrationen auf zwei Einflüssen beruhen muß: Einmal wird dadurch die Reaktionskonstante k_{+2} des katalytischen Schrittes beeinflusst, zum zweiten aber auch die Bildung des ES-Komplexes. Dazu muß noch bemerkt werden, daß eine völlige Substratsättigung des Enzymes einen Idealfall darstellt, der "realiter" nicht erreicht werden kann (Müller, 1970).

Eine Zunahme der Temperatur kann aber auch eine Erhöhung der Über-alles-Geschwindigkeit durch eine schnellere Bindung des Substrates an das Enzym oder durch einen beschleunigten Zerfall des ES-Komplexes bewirken. Die Affinität des Enzyms für ein Coenzym oder einen Aktivator kann steigen. Zudem kann sich eine temperaturbedingte Änderung der Ionisation oder des pH-Wertes auf einige oder alle Reaktionsteilnehmer entscheidend auswirken (Dawes).

Nach Dixon und Webb (1958) ist der erkennbare Temperatureffekt auf eine Reaktion die Resultante von Einzeleffekten auf verschiedenen Stufen. Das bedeutet, daß zumindest 18 thermodynamische Parameter für die "hin-Reaktion" existieren. Nämlich die Enthalpie, die freie Energie und die Entropie für die Aktivierung und die gleichen Parameter für den Reaktionsprozeß und diese Größen für alle drei Stufen.

5.4. Unstetigkeiten im ARRHENIUS-Diagramm

Wir beobachteten mehrfach eine nicht lineare Temperaturabhängigkeit in den ARRHENIUS-Diagrammen, die die Ergebnisse unserer Versuche zeigten. Diese Unstetigkeiten, die sich als "Knickpunkte" bei bestimmten Temperaturen darstellten - oberhalb und unterhalb dieser "kritischen Temperatur" erhält man unterschiedliche Werte für die Aktivierungsenergie (Müller, 1970) - wurden mehrfach schon bei isolierten Enzymreaktionen angegeben. Zu dieser Problematik wurde nun eine Reihe von Modellen erstellt, die diese Phänomene erklären sollten. Diese Modelle finden hier ihre Erwähnung, da sie exakte Ergebnisse zeigen und da sie Verständnis für die Diskontinuitäten im ARRHENIUS-Diagramm wecken. Vorab muß allerdings die Wertigkeit dieser Theorien für unsere Ergebnisse betont werden:

- a) Diskutiert werden Ergebnisse, die an isolierten Enzymen unter "in vitro" Bedingungen gefunden wurden.
- b) Es handelt sich hier um Enzyme, die nicht die von uns beobachteten Stoffwechselwege katalysierten.
- c) Zudem scheint die Leber nicht das geeignete Organ für die Durchleuchtung von Enzymkinetiken zu sein.
- d) Die Frage nach dem geschwindigkeitsbestimmenden Schritt einer Ketten-Reaktion ist nicht immer exakt zu beantworten.

Wird der Logarithmus der Reaktionsgeschwindigkeit nun gegen den Reziprokwert der absoluten Temperatur aufgetragen, so erhält man, wie oben bereits erwähnt wurde, des öfteren 2 oder mehr Geraden, die sich in Umschlagpunkten treffen und dort den Übergang der Aktivierungsenergie in eine andere anzeigen. Dixon und Webb diskutieren in ihrem Lehrbuch folgende Möglichkeiten (1958):

- a) Ein Phasenwechsel in der Lösung

Lipase (Ayenger, Roberts, 1952), Trypsin (Adams, Whittaker, 1950), Pepsin (Abraham, Robinson, 1937) wurden bei sehr niedrigen Temperaturen beobachtet und in jedem Fall gibt es einen großen Unterschied von E bei 0°C . Es scheint jedoch, daß der Phasenwechsel von Wasser, von flüssig zu fest, nicht die Ursache dieses Un-

terschiedes von E ist, denn man kann das gleiche beobachten, wenn das Gefrieren durch hohe Konzentrationen von Glycerol verhindert wird (Sizer, 1943).

- b) Zwei Parallelreaktionen, die von verschiedenen aktiven Zentren katalysiert werden und einen unterschiedlichen Temperaturkoeffizienten haben

Die Geschwindigkeit der Reaktion mit dem größeren Temperaturkoeffizienten steigt stärker an als die der anderen; daher herrscht diese Reaktion bei der höheren Temperatur vor. Man könne deshalb erwarten, daß bei den höheren Temperaturen die größere Aktivierungsenergie beobachtet wird und daß das ARRHENIUS-Diagramm nach oben konkav verläuft. Das ist jedoch genau das Gegenteil von dem, was gewöhnlich beobachtet wird. Darüber hinaus wird nach dieser Theorie die Unstetigkeit nicht scharf sein, außer die zwei Aktivierungsenergien unterscheiden sich durch einen großen Betrag.

- c) Ein Über-alles-Prozeß, der zwei aufeinander folgende Reaktionen mit unterschiedlichen Temperaturkoeffizienten beinhaltet

Die Reaktion mit dem größeren Temperaturkoeffizienten wird bei höheren Temperaturen schneller ablaufen und der "Über-alles-Prozeß" wird durch die andere Reaktion limitiert. Dies führt dann zu einem bekannteren Typ der Unstetigkeit, wobei dann bei den höheren Temperaturen die niedrigeren Aktivierungsenergien beobachtet werden und wobei das ARRHENIUS-Diagramm nach unten konkav ist. So ein System wurde von Stearn (1949) theoretisch beschrieben und Smith (1957) schlug vor, daß dieser Effekt den beobachteten Temperatureffekt auf die Reaktionsgeschwindigkeit bei Papain erklären könnte.

- d) Die Enzyme existieren in 2 Formen mit verschiedenen Aktivitäten

Wenn ein Enzym in 2 Formen existiert, die miteinander im Gleichgewicht stehen und dabei beide aktiv sind und verschiedene Aktivierungsenergien haben; darüber hinaus, wenn der Temperatureffekt

beim Wechsel der einen Form in die andere groß ist, so kann man eine scharfe Unstetigkeit beobachten. Nach Sizer (1943) hat die reduzierte Urease (Arnon et al., 1955) ein E von 8,7 gegenüber einem E von 11,7 der oxydierten Form. Bei diesen Zustandsformen werden keine Unstetigkeiten beobachtet. In einem schwach reduzierten Medium allerdings wird bei dieser Temperatur eine Unstetigkeit beobachtet. Wobei die Aktivierungsenergie der reduzierten Form oberhalb und die der oxidierten Form unterhalb von 22° C vorliegt. Sizer schlägt vor, daß mit Steigen der Temperatur das Enzym unmittelbar von der einen Form in die andere übergeht. Aber es ist nicht klar ersichtlich, weshalb ein solcher Wechsel vorhanden sein sollte. Massey (1953) spricht von einer Dissoziation der Enzyme in Einheiten von geringerem Molekulargewicht mit dem Temperaturanstieg. Diese kleineren Einheiten haben dann eine größere Aktivierungsenergie. Diese Dissoziation könnte, wie eine Denaturierung, einen höheren Temperaturkoeffizienten haben.

e) Reversible Inaktivierung von Enzymen

Kristiakowsky und Lumry (1949) stellten fest, daß, sobald ein Enzym mit der inaktiven Form im Gleichgewicht steht, der Enthalpiewechsel bei der Umwandlung einer Form in die andere ΔH_c beträgt und daß das ARRHENIUS-Diagramm eine Gerade zeigt, sobald das Enzym hauptsächlich in der aktiven bzw. in der inaktiven Form vorliegt. Im ersten Fall kann man aus der Steigung der Geraden die Aktivierungsenergie E berechnen und im zweiten Fall $E - \Delta H_c$. Das heißt, unabhängig vom Vorzeichen des Enthalpiewechsels verläuft die Kurve abwärts. Sie untersuchten die Urease und kamen zu dem Schluß, daß das Sulfit, als schwaches Reduktionsmittel verwendet, solche reversiblen Inaktivierungen von Enzymen bewirkt. Sie schlagen vor, daß ähnliche Effekte bei anderen Enzymen auf die gleiche Art erklärt werden könnten (Dixon und Webb, 1958).

Es muß nochmals nachdrücklich darauf hingewiesen werden, daß sich diese Interpretationen aus der Literatur auf isolierte Enzymreaktionen beziehen. So wird bei der RNase, deren Temperaturabhängigkeit Müller untersuchte, bei einer Temperaturänderung von einem Übergang von einer oder mehreren - bei niedrigen Tem-

peraturen beständigen - Formen zu denen, die bei höheren Temperaturen vorliegen, von einem schrittweisen Entfaltungsvorgang, der eine große Anzahl von Zwischenstufen durchläuft, gesprochen (Poland, Sheraga, 1965). Die Messung der Absorptionsspektren und der Viskosität und Denaturierungsversuche durch Lösungsmittel erbrachten den Beweis für die Existenz vieler derartiger Stufen (Holcomb, van Holde, 1962; Scott, Sheraga, 1963; Beck et al., 1965; Bigelow, 1963; Barnard, 1964; v. Hippel, Wong, 1963). Müller (1970) scheint es daher gerechtfertigt, in dem untersuchten Temperaturbereich von "Schmelzen" nur weniger Aminosäurereiste zu sprechen; auch wenn diese nur geringgradigen Proteinveränderungen mit physikalischen Methoden bisher noch nicht erfaßbar sind (Temperaturbereich von 35°C bis 10°C). Unter "Schmelzen" sei hier die räumliche Veränderung eines geringen Protein-Bereiches verstanden, die innerhalb weniger Grade vollständig und reversibel erfolgt. Das "Schmelzen" führt zu Lageveränderungen am aktiven Zentrum oder in dessen Nachbarschaft. Es wird somit klar ersichtlich, daß Temperatureinflüsse mannigfache Möglichkeiten besitzen, auf das Enzymprotein einzuwirken. Man braucht lediglich an den komplizierten Aufbau der Eiweißmoleküle denken, an deren Primär-, Sekundär-, Tertiär- und Quartärstruktur (Hermans, Sheraga, 1961; Hess, 1974).

In einem so komplexen System, wie es ein perfundiertes Organ darstellt, treten noch zusätzliche Probleme bei der Interpretation auf. So zum Beispiel sind die gemessenen metabolischen Geschwindigkeiten die "Über-alles-Geschwindigkeiten" einer Kette von einzelnen Reaktionen, wobei allerdings eine Reaktion den jeweils geschwindigkeitsbestimmenden Schritt darstellt. Wir können zudem nicht erwarten, daß der limitierende Schritt über den gesamten Temperaturbereich nicht wechselt, wir müssen vielmehr mit der Möglichkeit rechnen, daß in den beobachteten Reaktionszyklen der geschwindigkeitsbestimmende Schritt wechselt. Dies allein könnte zu einem "Knickpunkt" im ARRHENIUS-Diagramm führen.

Die Experimente haben gezeigt, daß die verschiedenen Stoffwechselprozesse eine unterschiedliche Temperaturabhängigkeit haben und daß auch die Temperaturabhängigkeit eines einzelnen Prozes-

ses sich mit der Temperatur ändern kann. Hypothermie bedeutet somit nicht eine gleichmäßige Verlangsamung des gesamten Stoffwechsels, wie angenommen wird. Es besteht vielmehr die Möglichkeit, daß infolge unterschiedlicher Temperaturabhängigkeit Störungen in der Koordination metabolischer Prozesse auftreten. Über die Art solcher Störungen ist zur Zeit noch nichts bekannt.

Zudem demonstrieren diese Experimente, daß diese Störungen wahrscheinlich nicht durch pH-Änderungen (wenn auch der pH-Wert nicht in der Leberzelle selbst bestimmt werden konnte) und durch Enzymverluste in den beobachteten Zeit- und Temperaturintervallen bedingt sein können. Wir konnten während der Perfusion keine entscheidenden Schäden, weder in der Zellmembran (geringe LDH-Austritte) noch für das Mitochondrium (geringe GldH-Austritte), in den beobachteten Zeiten der Hypothermie, nachweisen. Einschränkung muß allerdings gesagt werden, daß durch die hohen Durchströmungsvolumina eine subtile Bestimmung sowohl des pH-Wertes, als auch der Enzymaustritte, nicht möglich war.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Die Einflüsse der Hypothermie auf den Stoffwechsel der isolierten, Hb-frei perfundierten Rattenleber wurden durch Metabolitbestimmungen und Messung von gebildetem $^{14}\text{CO}_2$ untersucht. Wir fanden heraus, daß die näher untersuchten Stoffwechselwege - Glykolyse, Fructolyse, Glykogenolyse, Ketogenese, $^{14}\text{CO}_2$ -Produktion aus Pyruvat-3- ^{14}C und Octanoat-1- ^{14}C , oxydative Pyruvatdecarboxylierung, Gluconeogenese und Harnstoffsynthese - eine unterschiedliche Temperaturabhängigkeit zeigen. Zudem zeigen die Versuche, daß die einzelnen Stoffwechselprozesse in einzelnen Temperaturbereichen eine unterschiedliche Temperaturabhängigkeit besitzen. Die Q_{10} -Werte lagen zwischen 1,7 und 25 und entsprachen in erster Näherung Aktivierungsenergien von 38 bis 216 kJ/Mol. Die Langzeitexperimente, in der Dauer von 5 - 48 h, zeigten unter unseren Versuchsbedingungen eine Reversibilität der beobachteten Parameter des Intermediärstoffwechsels. Auch die anderen untersuchten Parameter, der pH und die Enzymaktivitäten (LDH, GldH, GPT, GOT) ergaben im Versuchsverlauf keine, die Funktion des isolierten Organs meßbar beeinträchtigenden Werte.

7. AUSBLICK

Die Ergebnisse dieser Arbeit müssen als ein Screening-Programm angesehen werden, das der Grundlagenforschung angehört. Um die Lebertransplantation als verantwortungsbewußte Therapie anzubieten, müssen weitere gründliche Untersuchungen erfolgen.

Die Frage nach der Organkonservierung steht dabei im Vordergrund. Die Anforderungen, die an die Konservierungsverfahren gestellt werden müssen, sind vielschichtig. Ziel ist eine möglichst lange Funktionstüchtigkeit des Organs Leber. - Die Leber besteht aus vier Zelltypen: a) das Leberparenchym, b) das Gallengangssystem, c) das Gefäßsystem, d) das Retikulo-Endotheliale-System.

Die hypotherme Dauerperfusion gilt bei Langzeitperfusion als die erfolgreichste Methode (Brettschneider et al., 1968; Beizer et al., 1970; Sung und Woods, 1974), wohingegen bei der einfachsten Methode, der hypothermen Lagerung 10stündige Ischämiezeiten erreicht werden (Brettschneider, 1971). Die Kompromißlösung der hypothermen Lagerung mit intermittierender Schwerkraftperfusion ergibt 14- bis 15stündige Ischämie-Zeiten (Calne, 1972; Lie et al. 1974). Aber es soll nicht nur die optimale Methode der Lagerung gefunden werden, auch die Perfusionslösungen sind auf Brauchbarkeit zu untersuchen. Im Gegensatz zum biochemischen Modell - es sollen keine in den Stoffwechsel eingreifenden Substanzen verwendet werden - sollen verschiedene Lösungen - Blut (Miller et al. 1951), Elektrolytlösungen (Starzl et al. 1965), Plasma-, Albuminlösungen (Slapak und Mati, 1974), Fluorocarbonverbindungen (Clark, 1974) - nach der initialen Spülung mit erythrozytem-freiem Medien (Mieny und Eisemann, 1968; Lie et al. 1973; De Miguel et al. 1974) erprobt werden. Auch Zusätze im Sinne von Stoffwechselhemmern und Membranstabilisatoren sollen auf Tauglichkeit geprüft werden. Beträchtliche Schwierigkeiten bereitet auch die Testung der zu transplantierenden Leber auf ihre Integrität. Physiologische - Membranpotentialmessungen in der Leberzelle (Lambotte, 1970) - bioelektrische - K-Haushalt (Abouna et al. 1969; Kesten, 1965), Impedanzmessungen (Lanner et al. 1973; Rigler et al. 1974) - und biochemische - Bromsulphthalein-Clearence (Eiseman et al. 1965), Glykogensynthese, Ammoniakclearance

(Mieny und Myborough, 1971) - Methoden müssen in ihren Aussagen und in der Verwertbarkeit erprobt und gegeneinander abgewogen werden. Des weiteren sollte man das bei Poikilothermen postulierte "Kryoprotektive Agens" (Raison und Lyons, 1971) als zusätzlichen Schutzfaktor im Auge behalten.

Die Probleme der Transplantatabstoßung müssen von den Immunologen weiter beobachtet werden. Nach heutigem Wissensstand liegt bei der Transplantatabstoßung am ehesten eine Reaktion vom verzögerten Typ vor (Eder und Gedigk, 1974). Es können aber auch präexistente Antikörper gegen HLA-Antigene mit im Spiel sein. Obwohl die Leber weniger abstoßungsgefährdet ist als zum Beispiel das Herz oder die Niere, muß man eine Transplantat-Toleranz herbeiführen - aktives Enhancement, Glucocorticoide, Cytostatika, Anti-Lymphozyten-Serum -. Trotz aller Erfolge haben die immunologischen Probleme auch heute noch keine befriedigende Lösung, die wahrscheinlich nur durch die Herbeiführung einer endogenen Transplantat-Toleranz erbracht werden kann (Eder und Gedigk, 1974). Die genaue Kenntnis des Intermediärstoffwechsels erscheint zudem nötig um erfolgreiche Versuche an größeren Versuchstieren zu starten. Das Schwein bietet sich nach Tunell (1972) als das geeignetste Tier in der kinderchirurgischen Forschung an. Ein weiteres Problem ist die Frage nach der geeignetsten Spenderleber, da das Spenderorgan möglichst kleiner sein sollte als das entfernte Organ.

Die Darstellung dieser noch zum Teil ungenügend durchleuchteten Probleme im Großkomplex der Lebertransplantation zeigen die Schwierigkeiten auf, die noch bewältigt werden müssen. Operationskomplikationen und die sich anschließende Intensivüberwachung werden - wie bei allen großen Eingriffen - das Transplantations-team immer wieder zu größtem Einsatz fordern.

8. LITERATURVERZEICHNIS

- (1) Abouna, G. M.,
Koo, C. G.,
Howanitz, L. F.,
Ancarani, E.,
Porter, K. A. Successful orthopic liver trans-
plantation after preservation
with simple cooling
Transpl. Proc. 3 (1971) 650
- (2) Abouna, G. M.,
Ashcraft, T.,
Hull, C.,
HODSON, A.,
Kirkley, J.,
Walder, D. N. The assesment of function of the
isolated perfused porcine liver
Brit. J. Surg. 56 (1969) 289
- (3) Abouna, G. M. Pig liver perfusion with human
blood. The effect preparing and
flushing the liver with various
balanced solutions on its sub-
sequent viability and function
Brit. J. Surg. 55 (1968) 761
- (4) Abraham, E. P.,
Robinson, R. Crystallisation of Lysozyme
Nature, Lond. 140 (1937) 24
- (5) Adams, D. H.,
Whittaker, V. P. The cholinesterases of human
blood. II. The forces acting be-
tween and enzyme and substrate
Biochim., biophys. Acta 4 (1950)
543
- (6) Arnon, D. T.,
Whatley, F. R.,
Allen, M. B. Vitamin K as a cofactor of photo-
synthetic phosphorylation
Biochim., biophys. Acta 16 (1955)
607
- (7) Arrhenius, S. Quantitative Laws in Biological
Chemistry
Bell and Sons, London (1915)

- (8) Ayenger, P.,
Roberts, E. Utilisation of D-glutamic acid by
 Lactobacillus Arabinosus: Glutamic
 Racemase
 J. biol. Chem. 197 (1952) 453
- (9) Barnard, E. A. The unfolding and refolding of
 Ribonuclease in Urea solutions.
 II. The enzymic activity in Urea
 and some states of unfolding
 J. Mol. Biol. 10 (1964) 263
- (10) Beck, K.,
Gill, S. J.,
Downing, M. Heat of transition of Ribonuclease
 A.
 Jacs, 87 (1965) 901
- (11) Beizer, F.O.,
May, R.,
Berry, M. N.,
Lee, J. C. Short term preservation of por-
 cine livers
 Journ. Surg. Res. 10 (1970) 55
- (12) Bigelow, W. G. The denatured states of Ribo-
 nuclease
 J. Mol. Biol. 8 (1963) 696
- (13) Brauer, R. W.,
Pesotti, R. L.,
Pizzolato, P. Isolated rat liver preparation.
 Bile production and other basic
 properties
 Proc. Soc. exp. Biol. 78 (1951)
 174
- (14) Brendel, W.,
Müller, Ch.,
Reuben, H. J.,
Messmer, K. Elektrolytveränderungen in tiefer
 Hypothermie
 Pflügers Archiv 288 (1966) 220
- (15) Brettschneider, L. zit. nach Lie, T.S. "persönliche
 Mitteilung"
 Z. ges. exp. Med. 155 (1971) 211

- (16) Brettschneider, L., The use of combined techniques
Daloze, P., for extended storage of orthopic
Huguet, C., liver homografts
Porter, K. A., Surg., Gynecol., Obstet. 126
Groth, C. G., (1968) 263
Kashiwagi, N.,
Hutchinson, D. E.,
Starzel, T. E.
- (17) Callaghan, P. B., Effect of varying carbon dioxide
Lister, J., tensions on the oxyhemoglobin
Paton, B. C., dissociation curves under hypo-
Swan, H. thermic conditions
Ann. Surgery 154 (1961) 903
- (18) Calne, R. Y. Liver transplantation in man.
I. Observations on technique and
organisation in five cases.
Transplant. Proc. 4 (1972) 773
- (18) Clark, L. C. Ring versus straight chain per-
fluorcarbon emulsion media.
Microvas. Res. (1974)
- (20) Clark, L. C. Monitoring and control of blood
tissue O₂ tensions
Amer. Soc. Art. Int. Organe 2
(1956) 41
- (21) Clark, L.C., Continous recording of blood
Wolf, R., oxygen tensions by polarography.
Granger, D., J. appl. Physiol. 6 (1953) 189
Taylor, Z.
- (22) Corey, E.L., Glycogen levels in the isolated
Britten, S.W. liver perfused with corticoadrenal
extract, insulin and other pre-
parations
Amer. J. Physiol. 131 (1941) 783
- (23) Dawes, E.A. Quantitative problems in bio-
chemistry
5th edition, Churchill, Livingstone,
166

- (24) De Miguel, E., Pig liver perfusion with membrane
Fresneda, V., oxygenator: A study of liver
Gonsalvez, M., viability by means of the mito-
Soberon, R., chondrial respiration test
Martinez, R., J. surg. Res. 17 (1974) 186
Garcia-Romero, E.,
O'Conner, F.,
Castollo-Olivares, J.L.
- (25) Dixon, M., Enzymes
Webb, E.C. Longmans, Green and Co, London,
New York, Toronto (1958)
- (26) Du Bois, R.S., Orthopic liver transplantation for
Rodgerson, D.O., Wilson's disease
Martineau, G., Lancet (1971) 505
Shorter, G.,
Giles, G.,
Lilly, J.,
Starzel, T.E.
- (27) Eder, M., Lehrbuch der allgemeinen Patholo-
Gedigk, P. gie und der pathologischen Anato-
mie
Springer Verlag, Berlin, Heidel-
berg, New York (1974)
- (28) Eiseman, B., Heterologous liver perfusion in
Liem, D.S., tratment of hepatic failure
Raffuci, F. Ann. Surg. 162 (1965) 329
- (29) Harper, H.A., Physiologische Chemie
Löffler, G., Springer Verlag, Berlin, Heidel-
Petrides, P.E., berg, New York (1975)
Weiss, L.
- (30) Hermans, J. jr., Structural studies of Ribonuclease
Sheraga, H.A. J. Amer. Soc. 83 (1961) 3293
- (31) Hess, B. Influence of temperature on enzyma-
tic activities and enzymatic
processes
Drug Res. 24 (1974) 961

- (32) v. Hippel, P.H.,
Wong, K.Y. The collagengelatin phase transition. II. Shape of the melting curves and effect of chain length
Biochimistry 2 (1963) 1399
- (33) Holcomb, D.N.,
van Holde, K.E. Ultracentrifugal and viscosimetric studies of the reversible thermal denaturation of Ribonuclease
J. Phys. Chem. 66⁷⁻¹² (1962) 1999
- (34) Humphries, A.L. jr. Problems of organ preservation, organ preservation: A review
Transplantation Vol. 5 No. 4
Part 2 of two parts USA (1967)
- (35) Kesten, P.J. L'Hyperthermie sélective du foie.
Acta Chir. Belg. 64 (1965) 326
- (36) Kirk, E. Amino acid and amonia metabolism in liver disease
Acta med. Scand 77 (1936) 1
- (37) Krebs, H.A.,
Henseleit, K. Untersuchungen über die Harnstoffbildung im Tierkörper
Z. Physiol. Chem. 210 (1932) 33
- (38) Kristiakowsky, G.B.,
Lumry, R.J. Anomalous temperature effects in the hydrolysis of Urea by Urease
Jacs 71 (1949) 2006
- (39) Lambotte, L. Use of hepatic cell membrane potential measurement to evaluate new methode of liver preservation
Surgery 74/4 (1973) 509
- (40) Lambotte, L. Membran Potential.A new assay for preserved organs viability
Dur. Surg. Res. 2 (1970) 241
- (41) Lambotte, L.,
Kestens, P.I.,
Haxhe, I.I. Sodium gain and potassium loss produced in the liver by adrenaline
Archives Internationales de Physiologie e de Biochimie, 77 (1969)345

- (42) Lanner, G.,
Rigler, B.,
Tentzeris, M.,
Argypropoulos, G.,
Herman, W.,
Stenzl, W. Studien und Ergebnisse der Impe-
danzmessung an der transplantierten Leber
Kongreßbericht 14. Tg. Österreichische Gesellsch. f. Chirurgie
Granz, Dorrong Verlag 1973, 418
- (43) Lie, T.S.,
Käufer, Ch.,
Stedek, M.,
Prange, C.H.,
Rommelsheim, K.,
Filimann, B.,
Gütgemann, A. Verlängerte ischämische Toleranz-
zeit der menschlichen Leber mit
erfolgreicher Transplantation
Mücnh. med. Wschr. 116 (1974) 1013
- (44) Lie, T.S.,
Totovic, V.,
Lagace, R.,
Ottersky, G.,
Lee, K.S.,
Böhmer, F.,
Last, R. Einfache Methode zur Konservierung
der Schweineleber
Res. exp. Med. 160 (1973) 122
- (45) Massay, V. Studies on Fumarase. 3. The effect
of temperature
Biochem. J. 53 (1953) 72
- (46) Mieny, C.J.,
Mybourgh, J.A. Successful twenty-hour preserva-
tion of the primate liver by
simple cooling
Transplant. 11 (1971) 459
- (47) Mieny, C.J.,
Eisemann, B. Liver preservation: Unperfused
cold storage and continous perfu-
sion.
Surgery, 63 (1968) 923

- (48) Miller, L.L.,
Bly, C.G.,
Watson, M.L.,
Bale, W.B. The dominant role of the liver
in plasma protein synthesis. A
direct study of the isolated per-
fused rat liver with the aid of
lysine-e-C¹⁴
J. expt. Med. 94 (1951) 431
- (49) Müller, W. Zur Ermittlung kinetischer Parame-
ter und deren Temperaturverhalten
bei der Hydrolyse von Ribonuclein-
säure und cyclischem Cytidin-2',3'-
Phosphat durch Ribonucelase
Dissertation, München 1970, TU
- (50) Poland, D.C.,
Sheraga, H.A. Statistical mechanics of non-
covalent bonds in polyamino acids.
IX. The two-state theory of pro-
tein denaturation
Biopolymers 3 (1965) 401
- (51) Raison, J.K.,
Lyons, J.M. Alteration of mitochondrial mem-
branes as a requisite for metabolism
at low temperature
Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.)
68 (1971) 2092
- (52) Reuben, H.J.,
Aigner, P.,
Brendel, W.,
Messmer, K. Elektrolytveränderungen in tiefer
Hypothermie
Pflügers Archiv 288 (1966) 197
- (53) Rigler, B.,
Lanner, G.,
Herrmann, W.,
Stenzl, W. Vergleichende Studien der Impe-
danzmessung an der transplantierten
Leber
Langenbeck's Arch. klin. Chir.
336 (1974) 173
- (54) Schimmassek, H. Perfusion of isolated rat liver
with a semi-synthetic medium and
control of liver function
Live Sciences 11 (1962) 629

- (55) Scholz, R.,
Hansen, W.,
Thurman, R. G. Interaction of mixed-function
oxidation with biosynthetic pro-
cess. 1. Inhibition of Gluconeoge-
nesis by Aminopyrine in perfused
rat liver
Europ. J. Biochem. 38 (1973) 64
- (56) Scholz, R. Hämoglobinfreie Durchströmung der
isolierten Rattenleber und Unter-
suchungen zur Redoxkompartimentie-
rung
Habilitationsschrift (1967)
- (57) Scholz, R.,
Bücher, Th. Hemoglobin-free perfusion of rat
liver. Control of energy metabolism
Ed. B. Chance Academic Pr. N.Y.
(1965) 393
- (58) Scott, R.A.,
Sheraga, H.A. Structural studies of Ribonucelase.
XI. Kinetics of denaturation
Jacs 85 (1963) 3866
- (59) Sizer, J.W. Effect of temperature on enzyme
kinetics
Advanc. Enzymol. 3 (1943) 35
- (60) Slapak, M.,
Mati, T. Long-term preservation of the
canine liver using auxiliary
autotransplantation as a functional
test
Transpl. Proc. 6 (1974) 295
- (61) Smith, R.A.,
Frank, J.F.,
Gunsalus, I.C. Isolation of an extracellular
protein from pennicilin inhibited
escherichia Coli cells
Fed. Proc. 16 (1957) 251

- (62) Starzl, T.E.,
Marchioro, T.L.,
Porter, K.A.,
Taylor, P.D.,
Faris, T.D.,
Herman, T.J.,
Hlad, C.J.,
Wadell, W.R. Factors determining short- and
longterm survival after ortho-
topic liver homotransplantation
in the dog
Surgery 57 (1965) 131
- (63) Stearn, A.E. Kinetics of biological reactions
with special reference to enzymic
processes
Advanc. Enzymol. 9 (1949) 25
- (64) Sung, D.T.W.,
Woods, J.E. Forty-eight-hour preservation of
the canine liver
Ann. Surg. 179 (1974) 422
- (65) Trowell, O.A. Urea formation in the isolated
perfused liver of the rat
J. Phys. 100 (1942) 432
- (66) Tunell, W.P.,
Anderson, K.D.,
Marshall, F.,
Lilly, J.R. The pig in pediatric surgical
research
J. Ped. Surg. 7 (1972) 511
- (67) Warburg, O. Chemische Konstitution von Fermen-
ten
Erg. Enzymforschung 7 (1938) 210
- (68) Zimmer, P. Der Malat-Aspartat-Zyklus: ein
Mechanismus für den Transport von
reduzierenden Äquivalenten zwischen
Zytosol und Mitochondrien
Dissertation, München 1973, LMU

Meinem Doktorvater, Herrn Professor Dr. med. W. Ch. Hecker, danke ich sehr für die Überlassung des Themas und die Korrektur der Arbeit.

Herrn Professor Dr. med. R. Scholz danke ich besonders für die Unterstützung und Durchsicht meiner Arbeit und die Möglichkeit, in seinen Laboratorien zu arbeiten.

Großen Dank bringe ich meinem geschätzten Freund, Herrn Dr. med. Franz Zimmermann, für seine unermüdliche Hilfe und Diskussionsbereitschaft vom Beginn der Labortätigkeit bis zum Verfassen der Manuskripte entgegen.

Eine weitere Unterstützung verdanke ich Frau S. Kling, ohne deren Hilfe und qualifizierten Fähigkeiten diese Arbeit nur bedingt durchführbar gewesen wäre.

LEBENS LAUF

Am 1. April 1951 wurde ich in München als Sohn des Dipl.-Mathematikers Otto Dietz und seiner Ehefrau Hedwig Dietz, geb. Ewerling, geboren.

Dem Volksschulbesuch von 1957 bis 1962 in München-Bogenhausen folgte die neunjährige Ausbildung am Luitpold-Gymnasium in München. Im Mai 1971 legte ich die Reifeprüfung ab.

Im Wintersemester 1971/72 begann ich an der Ludwig-Maximilians-Universität das Medizinstudium. Zwei Semester später legte ich das Vorphysikum und nach weiteren 3 Semestern das Physikum ab. Im März 1975 bestand ich den I. Teil, im März 1977 den II. Teil des Staatsexamens.

Im praktischen Jahr war ich in der Chirurgischen Poliklinik der Neurochirurgischen Klinik und der Radiologischen Klinik der Ludwig-Maximilians-Universität, zudem im Westkrankenhaus in Augsburg tätig.

